



Technische
Universität
Braunschweig

Entwicklung von Cysteinprotease-Assays zur Validierung von Cysteinprotease-Inhibitoren am Beispiel der SARS-CoV Hauptprotease

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stephanie Kristin Ludewig
aus Göttingen

1. Referentin oder Referent: Professor Dr. Knut Baumann
2. Referentin oder Referent: Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am: 17.10.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.12.2011

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ludewig S., Kossner M., Schiller M., Baumann K., Schirmeister T.: Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays. *Curr Top Med Chem*, **2010**, 10, 368-382

Oehninger L., Alborzinia H., Ludewig S., Baumann K., Wölfl S., Ott I.: From Catalysts to Bioorganometallics: Do Grubbs Catalysts Trigger Biological Effects? *Chem Med Chem*, in Druck

Tagungsbeiträge

Ludewig S., Kossner M., Schirmeister T., Baumann K.: Detecting false-positive results in fluorimetric protease assays. (Poster) DPhG-Jahrestagung, **2009**, Jena

Ludewig S., Kossner M., Stempka M., Kisker C., Schirmeister T., Baumann K.: Hit validation for a fluorimetric SARS-CoV main protease assay. (Poster) DPhG-Jahrestagung, **2010**, Braunschweig

Ludewig S., Kossner M., Stempka M., Kisker C., Schirmeister T., Baumann K.: Hit validation in fluorimetric cysteine protease assays. (Poster) GDCh-Tagung "Frontiers in Medicinal Chemistry", **2011**, Saarbrücken

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Mentor, Prof. Dr. Knut Baumann, für die Überlassung dieses spannenden und vielfältigen Themas sowie die vielen Freiheiten in der Gestaltung meiner Arbeit bedanken.

Auch danke ich Prof. Dr. Ingo Ott für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Gleichwohl gilt mein Dank vor allem den Personen, die am SARS-Projekt mitgearbeitet haben: Meinem Kollegen Markus Kossner für die gemeinsame Suche nach wahren Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} sowie unseren Kooperationspartnern in Würzburg. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Universität Würzburg, für ihr stets offenes Ohr bei Problematiken im Assay. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Caroline Kisker und Martin Stempka für das Expressieren der SARS-CoV M^{pro}, Markus Schiller für das Synthetisieren des Substrates, Radim Vicik für die ausführliche Einführung in die praktische Durchführung des fluorimetrischen Enzymassays, Conny Heindl für die vielen parallelen Testungen in Würzburg sowie allen Mitgliedern des AK Schirmeisters, die mir Testsubstanzen überlassen haben. Ebenso danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die das SARS-Projekt unterstützt hat.

Ich bedanke mich bei Dr. Friederike Schön für die Organisation des „Minilabors“, ihre Unterstützung bei der Synthese des Isatins sowie die vielen aufmunternden Worte.

Auch danke ich den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Institutes für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Petra Reich, Sandra Meyer und Brigitte Babic, für die unendlich vielen Probeneinwaagen und die Probenvorbereitung für die NMR-Analytik. Ebenso bedanke ich mich bei Klaus Hartmann und Matthias Söchtig für die Versorgung mit Reagenzien sowie bei Frank Roese für den Nachbau der Dialysekammer.

Ich danke Petra Holba-Schulz (NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig) für die Aufnahme der NMR-Spektren, sowie Dr. Ulrich Papke (Massenspektrometrie-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig) für die Erstellung der Massenspektren.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Lutz Preu für die Unterstützung bei der Auswertung von NMR-Spektren.

Auch gilt mein Dank den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Heike Bunjes, Institut für Pharmazeutische Technologie, dabei besonders Birthe Strasdat und Sonja Joseph für die Unterstützung bei den DLS-Messungen.

Bei Daphny Kaminski, Sandra Grotefend und Nadine Tolle bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Analytik.

Jan Dreher danke ich für die Durchführung des strukturbasierten Sequenzalignments .

Zudem danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Baumann für die angenehme Zusammenarbeit und die unvergesslichen Klausurtagungen in Oderbrück: Sebastian Rohrer, Ulrike Schmidt, Markus Kossner, Jan Dreher, Florian Kölling, Janina Nolte, Christina Anthes, Magnus Matz, Daphny Kaminski, Désirée Baumann, Sabrina Wollenhaupt, Annkathrin Weißenborn sowie Shantheya Balasupramaniam.

Ebenso gilt mein Dank meinen Kollegen aus der Betreuung des vierten Semesters, Dr. Hans-Otto Burmeister, Lukas Kaminski, Janina Nolte, Birthe Strasdat, Sandra Grotefend, Thomas Hahne und Christian Kölln, für die vielen lustigen Stunden in der Analysenvorbereitung sowie die angenehme Zusammenarbeit.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen „Neubau-Mitarbeitern“, Dr. Hans-Otto Burmeister, Lukas Kaminski, Janina Nolte, Sascha Kühne, Xi Deng, Claudia Cianciulli, Sabine Redweik, Sandra Grotefend, Thomas Hahne und Tobias Rakow danke ich für die wertvollen Gespräche und kalorienreichen Kaffeerunden.

Auch möchte ich mich bei meinen fleißigen Korrekturlesern Janina Nolte, Ann-Kathrin Ludewig und meinen Eltern bedanken.

Neben den bereits genannten Personen möchte ich mich zudem bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für das gute Arbeitsklima und die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Magnus, dir danke ich für die schöne Zeit in Braunschweig.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während meiner Promotion und in allen Lebenslagen stets unterstützt haben.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klassifizierung und Vorkommen von Cysteinproteasen	1
1.2	Bedeutung von Cysteinproteasen bei Krankheiten	3
1.3	Katalysemechanismus und Strukturen von Cysteinproteasen	4
1.4	SARS – das schwere akute respiratorische Syndrom	9
1.4.1	Ursprung und Ausbreitung der Krankheit	9
1.4.2	Krankheitsbild	9
1.4.3	Behandlung der SARS	10
1.4.4	Charakterisierung des SARS-Coronavirus, dem Erreger der SARS	12
1.4.5	SARS-CoV Hauptprotease (SARS-CoV M ^{pro})	16
1.4.6	Inhibitoren der SARS-CoV Hauptprotease	18
1.5	Die Serinprotease Chymotrypsin	19
2	Zielsetzung der Arbeit	20
3	Enzymassay	22
3.1	Einleitung	22
3.2	Enzymkinetik und Hemmkonstanten	23
3.2.1	Reversible Hemmmechanismen	24
3.2.1.1	Kompetitive Hemmung	25
3.2.1.2	Nicht-kompetitive Hemmung	26
3.2.1.3	Unkompetitive Hemmung	27
3.2.1.4	Berechnung von K_i aus den Umsatz-Zeit-Kurven	27
3.2.2	Irreversible Hemmmechanismen	28
3.3	Assay-Techniken	29
3.3.1	Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou	30
3.3.2	Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson	30
3.3.3	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)	30
3.4	Fluorimetrische Substrate	32
3.4.1	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m)	33
3.5	Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays	34
4	Erarbeitung eines Assay-Arbeitsablaufs am Beispiel von Cathepsin B und Chymotrypsin	36
4.1	Bestimmung der Inhibition in Prozent	39

4.2	IC ₅₀ -Wert.....	40
4.3	Detektion falsch positiver Ergebnisse.....	41
4.3.1	Bestimmung des inneren Filtereffektes.....	41
4.3.2	Testen auf Aggregation.....	45
4.3.2.1	Zusatz von Triton X-100.....	47
4.3.2.2	Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA).....	48
4.3.2.3	Michaelis-Menten-Kinetik.....	50
4.3.2.4	Zentrifugieren	52
4.3.2.5	Dynamic Light Scattering.....	52
4.3.2.6	Transmissionselektronenmikroskop.....	55
4.4	Kovalente und nichtkovalente Bindungen.....	56
4.5	Reversible und irreversible Kinetik	58
4.5.1	Dialyse	59
5	Anwendung des erarbeiteten Arbeitsablaufs auf die SARS-CoV Hauptprotease	62
5.1	Auswahl potenzieller Inhibitoren für die Hitvalidierung.....	62
5.2	Ergebnisse der Testungen	68
5.2.1	Prozent Inhibition und IC ₅₀ -Werte der potenziellen SARS-CoV M ^{pro} Inhibitoren..	71
5.2.2	Detektierbare Aggregation.....	72
5.2.3	Prüfen des inneren Filtereffektes.....	74
5.2.4	Detektierbare kovalente Bindungen.....	74
5.2.5	Reversibilität und Irreversibilität der Bindung.....	75
5.3	Spezielle Untersuchungen zum Inhibitionsmechanismus ausgewählter Testsubstanzen.....	76
5.3.1	Diarylsulfone	76
5.3.2	Calmidazoliumchlorid	85
5.3.3	Hexachlorophen.....	86
5.3.4	Anilid – Testung auf kompetitive Kinetik	89
5.3.5	Isatin – Synthese und zusätzliche Testungen.....	91
5.4	Verifizierbare Literaturwerte	94
5.5	Diskussion der Ergebnisse.....	96
6	Selektivitätstestungen an unterschiedlichen Cysteinproteasen.....	100
6.1	Auswahl der Cysteinproteasen.....	100
6.2	Clostripain.....	103
6.2.1	Inhibitoren des Clostripains	103

6.2.2	Entwicklung eines fluorimetrischen Enzymassays für Clostripain	103
6.2.3	Testungen an Clostripain	109
6.3	Calpain-1	111
6.3.1	Therapeutische Bedeutung von Calpain-1	113
6.3.2	Inhibitoren des Calpain-1	113
6.3.3	Entwicklung eines fluorimetrischen Enzymassays an Calpain-1	114
6.4	Caspase-1	115
6.4.1	Therapeutische Bedeutung von Caspase-1	117
6.4.2	Inhibitoren der Caspase-1	118
6.4.3	Entwicklung eines fluorimetrischen Enzymassays für Caspase-1	118
6.5	Testung ausgewählter Inhibitoren an verschiedenen Cysteinproteasen	122
6.6	Diskussion der Ergebnisse	129
7	Zusammenfassung	131
8	Summary	135
9	Experimenteller Teil	139
9.1	Verwendete Messgeräte	139
9.2	Verwendete Reagenzien, Enzyme, Substrate	142
9.3	Analytische Methoden	144
10	Informationen zu den getesteten Substanzen	151
11	Literaturverzeichnis	152
	Anhang	165

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abz	ortho-Aminobenzoessäure, Anthranilsäure
Ala	Alanin
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BSA	bovines Serumalbumin
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)
CMK	Chloromethylketon
CoV	Coronavirus
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
Dabcyl	4-((4-(Dimethylamino)phenyl)-azo)-benzoessäure
DLS	Dynamic Light Scattering, (Dynamische Lichtstreuung)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
EC	Enzyme Commission
EDANS	(5-(2-Aminoethyl)amino)-naphthalin-1-sulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex
FRET	Fluorescence resonance energy transfer (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer)
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

HTS	High Throughput Screening
I	Inhibitor
ICE	Interleukin converting enzyme
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
MIC	Miconazolniträt
min	Minuten
M ^{pro}	main protease (Hauptprotease)
MR	Methylrot
mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)
nsp	nichtstrukturelles Protein
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
P	Produkt
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCS	Photonenkorrelationsspektrometrie
Phe	Phenylalanin
PL ^{pro}	Papain-like (Papain-ähnliche) Protease
pNA	para-Nitroanilid
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
Ser	Serin
T1	Thiobarbital
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol (INN)
Tyr	Tyrosin
V	Valin
(v/v)	Volumen pro Volumen
Val	Valin
(w/v)	Masse pro Volumen
Y	Tyrosin
Z	Benzyloxycarbonyl

1 Einleitung

Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Nach dem EC- bzw. IUBMB-System gehören diese der Klasse 3.4 der Hydrolasen an. Diese Klasse lässt sich in zwei Subklassen unterteilen, die Exopeptidasen (3.4.11-19) und die Endopeptidasen (3.4.21-24 zusammen mit 3.4.99). Als Exopeptidasen werden dabei Hydrolasen bezeichnet, die nur endständige Peptidbindungen spalten während Endopeptidasen Peptidbindungen innerhalb eines Proteins schneiden. Bei den meisten Proteasen handelt es sich um Endoproteasen. Nach dem katalytischen Mechanismus und der Zusammensetzung des aktiven Zentrums lassen sich die Endopeptidasen weiter in Untergruppen einteilen: 3.4.21 (Serin-Endopeptidasen), 3.4.22 (Cystein-Endopeptidasen), 3.4.23 (Aspartat-Endopeptidasen), 3.4.24 (Metalloendopeptidasen) und 3.4.25 (Threonin-Endopeptidasen).^[1, 2, 3]

Ein anderes System zur Klassifikation von Peptidasen ist das MEROPS-System.^[4] Danach werden die Proteasen nach Vergleich der Aminosäuresequenzen in Familien eingeteilt. Die Bezeichnung der Familien richtet sich nach dem katalytischen Typ (zum Beispiel C für Cystein), die angehängte Ziffer wird fortlaufend vergeben.^[3, 5, 6] Einige dieser Familien können aufgrund ähnlicher Abstammung, ohne direkte Homologie in den Aminosäuresequenzen aufzuweisen, in Clans zusammengefasst werden. Auch hier erfolgt die Bezeichnung, die aus zwei Buchstaben besteht, zunächst nach dem Katalysemechanismus (wieder C für Cystein). Der angehängte Buchstabe wird wiederum fortlaufend vergeben.

1.1 Klassifizierung und Vorkommen von Cysteinproteasen

Cysteinproteasen sind in allen Organismen zu finden: in Viren (hier lassen sich die meisten Cysteinproteasen finden, ein Beispiel ist die SARS-CoV M^{pro} des Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus), Bakterien (z.B. Clostripain in *Clostridium histolyticum*), Pilzen (z.B. Cathepsin B in *Aspergillus flavus*), Pflanzen (z.B. Papain in *Carica papaya*), Protozoen (z.B. Cruzipain in *Trypanosoma cruzi*) sowie bei Säugern.^[7, 8] Bei den Cysteinproteasen handelt es sich um ubiquitäre Enzyme, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind.

Sie werden nach dem MEROPS-System in neun Clans und knapp 59 Familien eingeteilt.^[4] Einige wichtige Cysteinproteasen sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

Tabelle 1.1: Klassifizierung wichtiger Cysteinproteasen nach MEROPS ^[4]

Clan	Familie	Subfamilie	Protease	Herkunft	Spezifität (Schnittsequenz)	Aktives Zentrum
CA	C1	C1A	Papain	Carica papaya		
			Cathepsin B	Homo sapiens	S ₂ : Arg	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Cathepsin L,S,K	Homo sapiens		
	C2		Calpain-1 (μ-Calpain)	Homo sapiens		Cys ⁻ , HisH ⁺
CD	C11		Clostripain	Clostridium histolyticum	Arg X	Cys ⁻ , HisH ⁺
	C14		Caspase-1 (ICE)	Homo sapiens	Asp X	Cys ⁻ , HisH ⁺
			Caspase-3	Homo sapiens		
PA	C30		SARS-CoV M ^{pro}	Humanes SARS- Coronavirus	LQ A	Cys, His
			TGEV M ^{pro}	Porcine transmissible Gastroenteritis Virus		

||=Spaltstelle im Peptid, ICE=Interleukin 1β Converting Enzyme, TGEV=Transmissible Gastroenteritis Virus, SARS=Severe Acute Respiratory Syndrome

Die meisten und bislang am besten untersuchten Cysteinproteasen lassen sich in Clan CA finden, der 24 Familien umfasst.^[9]

In diesem Clan lassen sich unter anderem die beiden wichtigsten humanen Cysteinproteasengruppen finden: die lysosomalen Cathepsine in Familie C1A (Cathepsin B, C, H, K, L, M, N, S, T, V, und W) sowie die zytoplasmatischen Calpaine in Familie C2 (Calpain-1 und -2).^[7, 8, 9, 10]

Familie C1 weist eine Reihe von Proteasen mit Endo- und auch Exopeptidaseaktivität auf. Subfamilie C1A, mit Papain als Prototyp, ist die am besten untersuchte Familie des Clans CA.^[11] Subfamilie C1B umfasst eine kleine Gruppe von Aminopeptidasen, die im Gegensatz zu den Proteasen der Subfamilie C1A nicht über Propeptide synthetisiert werden.^[10] Clan CD weist unter anderem die Familie der Caspasen (C14), auf, die eine wichtige Rolle bei

apoptotischen Vorgängen spielen. Hinsichtlich ihrer Struktur unterscheiden sich diese in starkem Maße von der Struktur des Papains.^[6] In Clan PA sind verschiedene Cysteinproteasen, wie SARS-CoV M^{pro} oder TGEV M^{pro}, aber auch Serinproteasen, wie Trypsin und Chymotrypsin zu finden, die sich hinsichtlich ihrer Struktur sehr ähneln und sich einzig im aktiven Zentrum durch Beteiligung eines Cystein bzw. Serins unterscheiden.^[10]

1.2 Bedeutung von Cysteinproteasen bei Krankheiten

Lange Zeit wurden Proteasen lediglich als proteinverdauende Enzyme angesehen. Durch nähere Betrachtung ihrer Funktionen und Aufgaben in einer Vielzahl von lebensnotwendigen Prozessen im Körper, wurde die Bedeutung von Proteasen in diversen Krankheitsverläufen deutlich.^[9, 12] Als ein Beispiel für die erfolgreiche Betrachtung einer Protease als Ziel für die Entwicklung von Arzneistoffen bei einer bestimmten Krankheit kann die Metalloprotease ACE dienen.^[12] Auch Cysteinproteasen spielen eine bedeutende Rolle bei diversen Erkrankungen. Lysosomale Cysteinproteasen sind eng verbunden mit Krankheiten wie Krebs, rheumatoide Arthritis, Osteoporose, multiple Sklerose, Diabetes, inflammatorische Ereignisse, Lungenkrankheiten, Leberkrankheiten, Batters Krankheit und lysosomale Störungen.^[13] In Tabelle 1.2 sind einige Krankheiten und die damit verbundenen Cysteinproteasen aufgeführt.

Tabelle 1.2: Bedeutung von ausgewählten Cysteinproteasen bei Erkrankungen

Cysteinprotease	Vorkommen	Funktion	Erkrankung bei Überexpression
Cathepsin B	ubiquitär	Ordnung in der Zelle (Abbau von Proteinen)	Krebs, rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis
Cathepsin K	Osteoklasten	Knochenabbau	Osteoporose, Osteoarthritis, rheumatoide Arthritis
Cathepsin L	ubiquitär	Ordnung in der Zelle (Abbau von Proteinen) Antigenpräsentation Haarfolikellentwicklung	Krebs, Atherosklerose, rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis
Cathepsin S	Antigenpräsentierende Zellen	Antigenpräsentation	Neurodegenerative Erkrankungen, Rheumatoide Arthritis, Atherosklerose

Cysteinprotease	Vorkommen	Funktion	Erkrankung bei Überexpression
Calpain-1	ubiquitär	Apoptose	neurologische Verletzungen, Schlaganfall, Alzheimer
Caspase-1	ubiquitär	Bildung des IL-1 β	rheumatoide Arthritis, systemisch inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS), Glomerulonephritis, insulinabhängiger Diabetes mellitus
Caspase-3	ubiquitär	Apoptose	Ischämie

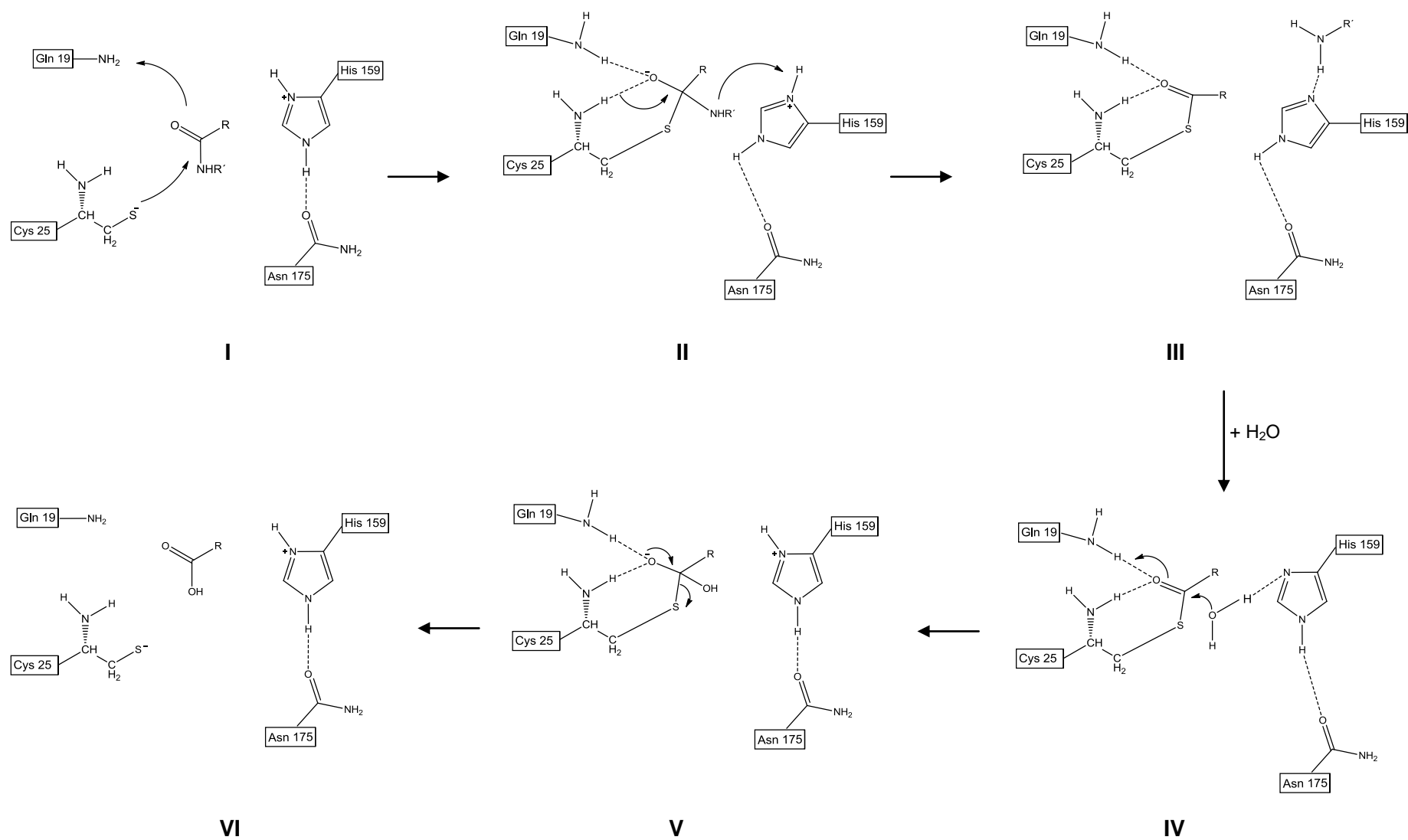
Quellen: Cathepsine:Fricker et al.^[14] Calpain-1:Wang et al.^[15], Huang et al.^[16] Caspase-1:Ku et al.^[17]

Durch ihre Bedeutung bei dieser Vielzahl von Krankheiten stellen Cysteinproteasen interessante Targets für die Entwicklung von Arzneistoffen dar. Für ein erfolgreiches Targeting einer Cysteinprotease ist es von großer Bedeutung die Bedingungen, unter denen das Enzym agiert, genau zu kennen und die Struktur sowohl des Enzyms als auch des nativen Substrates zu erforschen. Im Folgenden sollen daher die Strukturen und die Katalyse an einigen Beispielen näher betrachtet werden.

1.3 Katalysemechanismus und Strukturen von Cysteinproteasen

Der Katalysemechanismus der Cysteinproteasen kann an Papain als Prototyp exemplarisch dargestellt werden (Abbildung 1.1). Grundsätzlich lässt sich hier ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Serinprotease Chymotrypsin beobachten.^[10, 18]

Der Katalysemechanismus der Cysteinproteasen wird von einem Cystein und einem Histidinrest im aktiven Zentrum übernommen. Im Falle des Papains liegt im pH-Intervall 3,5 bis 8,0 die Thiofunktion des Cysteins deprotoniert und der Imidazolring des Histidins protoniert vor. Nicht bei allen Cysteinproteasen liegen Cystein und Histidin im aktiven Zentrum als Thiolat-Imidazolium-Paar vor (siehe Tabelle 1.1). Der Katalysemechanismus verläuft jedoch entsprechend zum Papain.

Abbildung 1.1: Katalysemechanismus des Papains^[7, 18, 19]

Im ersten Schritt der Katalyse (I) erfolgt ein nucleophiler Angriff des Thiolats am Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden peptidischen Bindung. In Folge dessen entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand (II), der über das „Oxyanionhole“ stabilisiert wird. Dabei werden sowohl vom Glutamin 19 als auch vom Cystein 25 jeweils von der Aminogruppe aus Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Im anschließenden Schritt bildet sich das acylierte Enzym unter Freisetzung eines Aminorestes (III). Die Deacylierung des Enzyms erfolgt anschließend durch Reaktion mit Wasser (IV). Im Folgenden bildet sich zunächst wiederum ein tetraedrischer Übergangszustand aus (V), der anschließend zum freien Enzym und dem freigesetzten Säurerest führt (VI).

Im Falle des Papains spielt das Asparagin 175 in der Katalyse zusätzlich eine Rolle für die Stabilisierung der räumlichen Orientierung des Histidins. Die Stabilisierung erfolgt dabei über eine Wasserstoffbrückenbindung vom Carbonylkohlenstoff des Asparagins zum Imidazolium des Histidins.

Die Katalyse erfolgt an ganz bestimmten Stellen innerhalb der Sequenz von Peptiden. Die Bezeichnung der Aminosäuren innerhalb der Erkennungssequenz der Proteasen bedarf einer einheitlichen Definition. Die Bindestellen im katalytischen Zentrum werden daher wie folgt nach Schechter und Berger^[20] benannt (Abbildung 1.2):

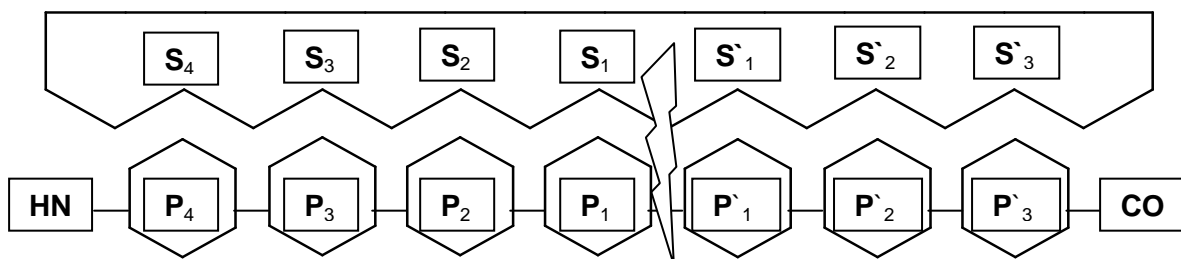


Abbildung 1.2: Substratbindestellen der Protease Papain (*Carica papaya*) nach Schechter und Berger

Das aktive Zentrum des Enzyms gliedert sich in Bindungstaschen („subsites“), die jeweils mit einer Aminosäure des Substrates interagieren. Ausgehend von der Spaltstelle in Richtung des N-Terminus werden diese Bindungstaschen mit S_1 - S_x und in Richtung des C-Terminus mit S'_1 - S'_x bezeichnet. Auf Seiten des Substrates ergibt sich daraus eine entsprechende Bezeichnung für die jeweils bindenden Aminosäuren (P_1 - P_x bzw. P'_1 - P'_x). Für Proteasen ist eine bestimmte Bindungstasche für die Substratbindung entscheidend. Zumeist ist die Bindungstasche S_1 am charakteristischsten.^[1] So bevorzugt zum Beispiel Clostripain in S_1 Arginin und die Caspasen Asparagin. Für Cathepsin B hingegen ist die S_2 Bindungstasche spezifisch. Hier wird die Aminosäure Arginin favorisiert.

Welche Aminosäuren von den jeweiligen Proteasen an den entsprechenden Positionen bevorzugt werden, ist unter anderem der MEROPS-Datenbank ^[4] zu entnehmen.

Strukturen von Cysteinproteasen:

Innerhalb der Subfamilie C1A unterscheidet man in die Papain-ähnlichen und in die Cathepsin B-ähnlichen Enzyme. Zu den Papain-ähnlichen Enzymen zählen unter anderem die Cathepsine O, H, L, K und S zu den Cathepsin B-ähnlichen die Dipeptidylpeptidase I. ^[10] Zunächst soll an dieser Stelle Papain als Prototyp der Papain-ähnlichen Enzyme und anschließend das Cathepsin B betrachtet werden.

Papain:

Papain (EC 3.4.22.2 bzw. C01.001) aus dem Latex von *Carica papaya* ist ein monomerisches Peptid bestehend aus 212 Aminosäuren. ^[7] Das aktive Zentrum setzt sich zusammen aus Cystein 25 und Histidin 159. ^[8, 11, 21] Zusätzlich sind noch weitere Aminosäuren für die Katalyse wichtig. Zum einen das Glutamin in Position 19 für die Bildung des „Oxyanionholes“ und zum anderen das Asparagin in Position 175 für die räumliche Orientierung des Imidazolrings des Histidins 159. ^[11] Papain zeigt in Position S₂ eine Präferenz für große hydrophobe Reste, wie beispielsweise Phenylalanin. ^[7, 11] Dieser Aspekt ist charakteristisch für diese Familie der Papain-ähnlichen Enzyme. ^[11] Die Struktur von Papain ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

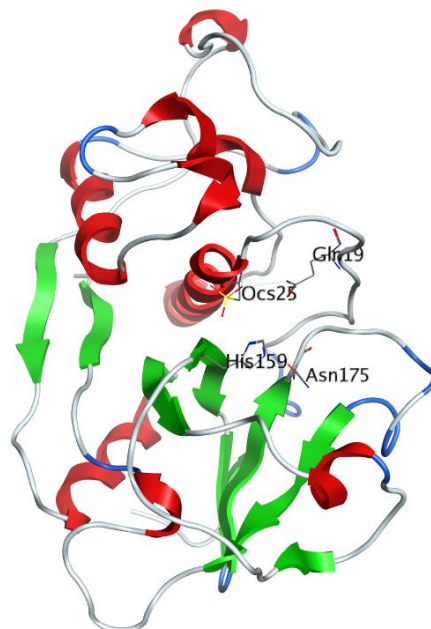


Abbildung 1.3: Kristallstruktur der Cysteinprotease Papain (pdb:9PAP)

Cathepsin B:

Cathepsin B (EC 3.4.22.1 bzw. C01.060) ist der zuerst und bestbeschriebene Vertreter der lysosomalen Cysteinproteasen.^[10] Es handelt sich dabei um eine Peptidase, die sowohl Endo- als auch Exopeptidaseaktivität besitzt. Dabei ist die Funktion als Exopeptidase auf ein besonderes Strukturmerkmal, den „occluding loop“, zurückzuführen. Der occluding loop besteht aus einer Kette von 18 Aminosäuren, wobei zwei Histidinreste für die Bindung zum negativ geladenen Carboxylatrest des C-Terminus verantwortlich sind: His110 und His111.^[22] Bei der Exopeptidaseaktivität werden Dipeptide vom C-Terminus aus geschnitten, daher rührt für diese Funktion auch die Bezeichnung als Peptidyl-Dipeptidase.^[10, 23, 24] Cathepsin B wird aus dem Cathepsin B Proenzym gebildet.

Eine wichtige Position innerhalb der Bindetasche, die für die Substratspezifität ausschlaggebend ist, ist Position P₂. Hier wird neben einem großen hydrophoben Rest, der an dieser Position innerhalb der Familie der Papain-ähnlichen häufig zu finden ist, wegen eines Glutaminrestes (Glu 245) in Position S₂ auch ein Arginin-Rest angenommen. Auf Basis dessen werden synthetische Substrate gewählt. Für selektive Messungen wird häufig ein Z-Arg-Arg-AMC für fluorimetrische Assays verwendet. Z-Phe-Arg-AMC ist dahingegen für eine Vielzahl von Cathepsinen anwendbar. So zeigt dieses Substrat neben der Verwendung im Cathepsin B-Assay auch im Cathepsin L-Assay eine gute Empfindlichkeit.^[10, 25]

Cathepsin B besteht aus zwei Domänen, die V-förmig zueinander angeordnet sind und so den Zugang zum aktiven Zentrum bilden. Das aktive Zentrum von Cathepsin B besteht aus einem Cysteinrest 29 und einem Histidinrest 199. Zusätzlich spielt Asn 219 eine stabilisierende Rolle in der Katalyse (siehe Katalysemechanismus am Beispiel des Papains, Abbildung 1.1).

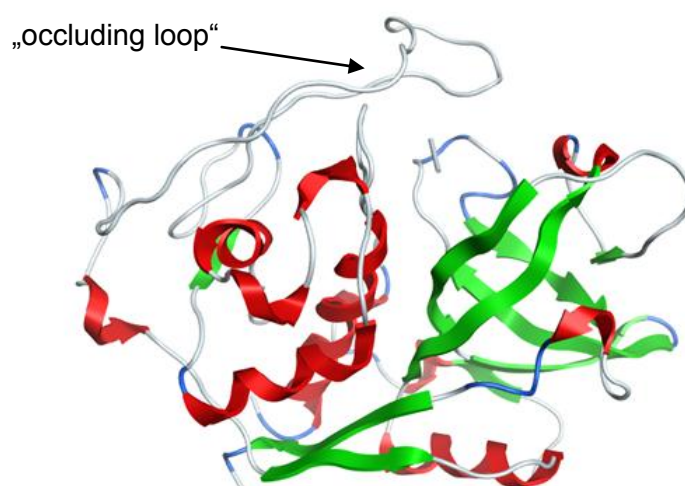


Abbildung 1.4: Kristallstruktur der Cysteinprotease Cathepsin B (pdb: 1CSB)

1.4 SARS – das schwere akute respiratorische Syndrom

1.4.1 Ursprung und Ausbreitung der Krankheit

Diese neuartige Infektionskrankheit trat erstmals Mitte November 2002 in der Provinz Guangdong in Südchina auf und verbreitete sich bis Juli 2003 in 32 Ländern.^[26, 27, 28, 29]

Erreger dieser Krankheit war ein bis dato unbekanntes Coronavirus. Die Übertragung der Krankheit erfolgt über engen Kontakt mit Patienten via Tröpfcheninfektion. Dies zeigte sich darin, dass neben Familienangehörigen vor allem medizinisches Personal an SARS erkrankte und diese Krankheit weiter verbreitete.^[26, 27, 29]

Im Zeitraum von November 2002 bis Juli 2003 wurden 8096 Fälle gemeldet. In 774 Fällen verlief die Erkrankung tödlich.^[30] Wie schwer die Krankheit verläuft, richtet sich dabei auch nach dem Alter. Nach Daten der WHO betrug die Mortalität bei bis zu 24-Jährigen lediglich 1%, in der Altersgruppe 25 bis 44 Jahre 6%, bei den 45- bis 64-Jährigen 15% und bei Menschen über 65 Jahre bereits 50%.^[31]

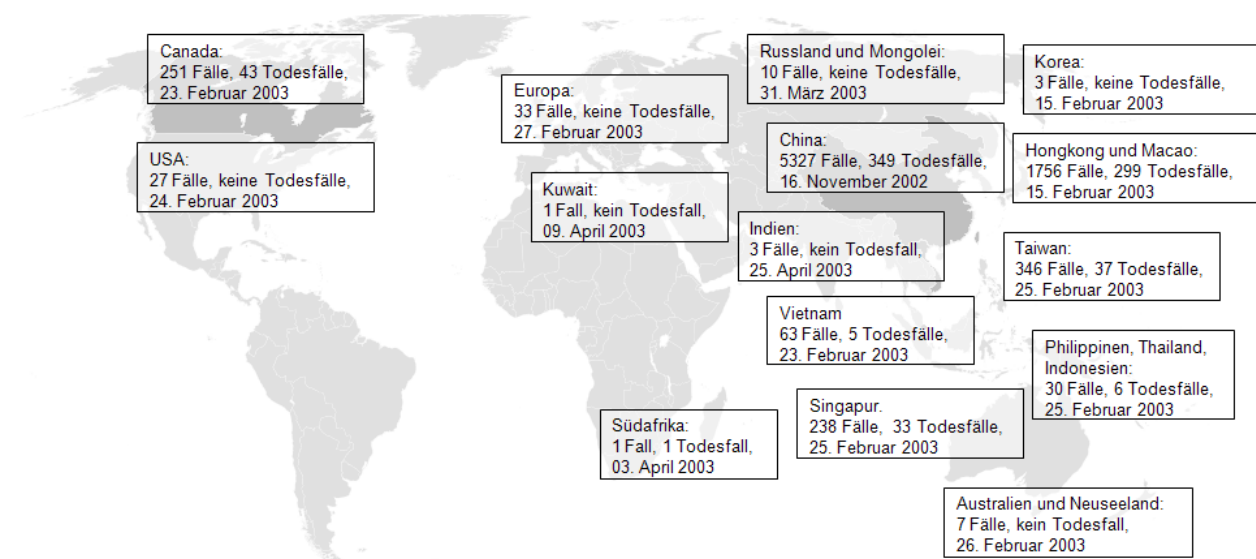


Abbildung 1.5: Ausbreitung der SARS, Quellen: Wikimedia commons: BlankMap-World6, compact.svg, Peiris et al.^[32], Christian et al.^[33]

1.4.2 Krankheitsbild

Bei dem schweren akuten respiratorischen Syndrom (SARS) handelt es sich um die Form einer schweren atypischen Pneumonie.^[29]

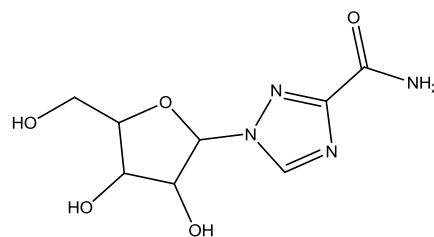
Die Inkubationszeit der SARS beträgt zwischen 2 bis 7 Tage, in seltenen Fällen auch bis zu 10 Tage. Zu den Symptomen der SARS zählen unter anderem sehr unspezifische Ereignisse. In der ersten Woche des Krankheitsverlaufes treten überwiegend grippeähnliche

Symptome wie Fieber, Unwohlsein, Kopfschmerzen und Schüttelfrost auf. In der zweiten Woche schließen sich respiratorische Syndrome wie Husten, Atemnot und Atemschwere an. Die Atemnot verschlechtert sich dabei rasch und geht mit erhöhtem Sauerstoffbedarf einher. In schweren Fällen, ca. 20% der Fälle, benötigten die betroffenen Patienten eine Intensivbehandlung mit künstlicher Beatmung.^[34, 35]

Die Diagnose SARS wird bei Eintritt folgender Ereignisse gestellt: Fieber über 38°C sowie mindestens ein Symptom aus dem Bereich der Atemwegserkrankung sowie ein radiologisches Zeichen von Lungeninfiltraten. Ein Nachweis des Erregers erfolgt letztlich über PCR und ELISA.^[36, 37]

1.4.3 Behandlung der SARS

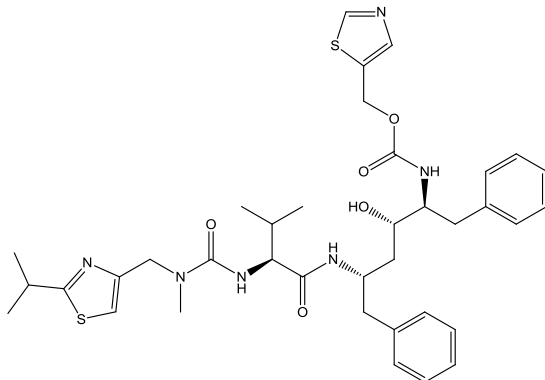
Zunächst besteht die zentrale Schwierigkeit darin, die Symptomatik der SARS vor allem in den ersten Tagen eindeutig von Erkrankungen mit ähnlichen Symptomen wie etwa der Grippe abzugrenzen. Daher bestand zunächst der erste Schritt darin, die betroffenen Patienten bis zur eindeutigen Diagnose unter Quarantäne zu stellen.^[38] Eine kausale Therapie ist bis heute nicht möglich. Es können ausschließlich die Symptome der SARS behandelt werden, sowie versucht werden, die Ausbreitung des Virus einzuschränken. Dazu wurde den Patienten antivirale Arzneistoffe wie das Ribavirin oder auch Oseltamivir verabreicht. Ribavirin ist als Nukleosidanalogen bereits gegen ein breites Spektrum an DNA- und RNA-Viren bekannt.^[39] Die antiviralen Arzneistoffe sollten dabei über die Einschränkung der Virusvermehrung eine Verschlechterung der respiratorischen Funktion vermeiden.^[38]



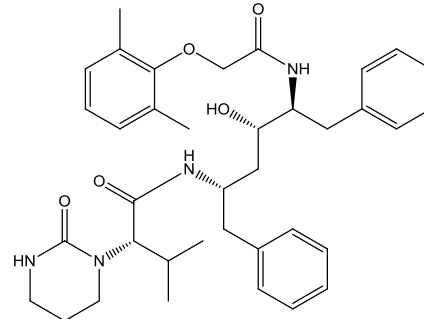
Ribavirin

Zusätzlich zur antiviralen Therapie wurden Steroide als Immunmodulatoren gegeben. Breitbandantibiotika wie β -Lactamantibiotika in Kombination mit Makroliden oder Fluorchinolone sollten zunächst bei noch nicht eindeutiger Diagnose der SARS die unspezifischen Symptome behandeln. Zusätzlich erhoffte man sich von den Fluorchinolonen und den Makroliden einen positiven Effekt auf den SARS-Krankheitsverlauf durch immunmodulatorische Eigenschaften.^[40]

Neben den genannten antiviralen Mitteln wurde mit HIV-Proteaseinhibitoren, wie Ritonavir und Lopinavir versucht in Kombination mit dem bereits genannten Ribavirin die Replikation des Virus über eine mögliche Hemmung der viralen Protease zu schwächen.^[40]



Ritonavir



Lopinavir

Als weitere Möglichkeit wurde die Gabe von Interferonen diskutiert. Hierbei erschien das Interferon β als vielversprechend in den *in vitro* Testungen.^[41]

In letzter Instanz blieb bei sehr schweren Krankheitsfällen die künstliche Beatmung eine zusätzliche Therapieoption, um den Patienten Linderung zu verschaffen.

So et al.^[42] veröffentlichten 2003 ein in Hong Kong angewandtes Protokoll für eine Standardbehandlung der Erkrankung. Demnach wurde bei ersten Anzeichen zunächst auf die Gabe von Antibiotika wie Levofloxacin oder Clarithromycin zurückgegriffen. Zeigten sich im weiteren Verlauf zusätzlich radiologische Befunde in der Lunge sowie keine deutliche Verbesserung des Zustandes nach zwei Tagen, so wurde die Gabe von Ribavirin und Methylprednisolon angeschlossen. Bei weiterer Verschlechterung der Sauerstoffsättigung wurde dann mit künstlicher Beatmung therapiert. Mit Hilfe dieses Therapieschemas konnten erste Erfolge in der Behandlung verzeichnet werden. Im Nachhinein wird jedoch der Nutzen der Gabe von Ribavirin in Kombination mit Steroiden diskutiert.^[43] Patienten, die in Hong Kong behandelt wurden, zeigten Spätfolgen wie beispielsweise Knochendegenerationen. Daher erschien die gezielte Behandlung der Krankheit über ein spezifisches Target sehr früh von großer Bedeutung, um die generelle Standardtherapie zu ersetzen.

Neben der Therapie der Schulmedizin wurde auch vielerorts versucht die Krankheit mit Mitteln der traditionellen chinesischen Medizin zu behandeln. Dabei erschien es als interessanter Aspekt, dass Glycyrrhizin gute Hemmwirkungen in *in vitro* Studien zeigte.^[44]

Ebenso erschien es nach den Erfahrungen der Pandemie sinnvoll, einen Impfstoff gegen das Virus zu entwickeln, um so eine weitere Verbreitung sowie erneuten Ausbruch zu vermeiden. Auch wenn die Krankheit nach 2003 nur noch partiell auftrat, wenn es bei Untersuchungen am Erreger zu Komplikationen gekommen war, so scheint es dennoch nicht unmöglich, dass

SARS nochmalig ausbrechen könnte. Ein möglicher Impfstoff ließe sich auf verschiedener Basis entwickeln. Zum einen unter Verwendung des inaktivierten kompletten Virus, eines attenuierten Lebendimpfstoffes oder auch den Untereinheiten oder exprimierten Proteinen des Virus. Bei letzterem bietet sich vor allem das Spike Protein (S Protein) des Virus an.^[45] Einige Impfstoffe befanden sich bereits in der Phase I der Klinischen Studien. Die Entwicklung eines kommerziellen Impfstoffes wird sich jedoch auch weiter danach richten, wie die Befürchtungen um zukünftige Krankheitsausbrüche stehen.^[32]

1.4.4 Charakterisierung des SARS-Coronavirus, dem Erreger der SARS

Aufgrund des zum Teil fatalen Verlaufes der Krankheit und der bedenklichen Zunahme an Fällen rief die WHO im März 2003 dazu auf, den Erreger der SARS zu identifizieren. Bereits im April 2003 wurden erste Ergebnisse bekannt.^[46, 47, 48]

Als Erreger dieser Infektionskrankheit wurde ein bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Coronavirus identifiziert, das SARS-Coronavirus (SARS-CoV). Dieses neuartige Virus erfüllte die Koch'schen Postulate: Der Erreger wurde in allen Krankheitsfällen gefunden und konnte vom Wirt isoliert sowie in Wirtszellen kultiviert werden. Ebenso war es möglich über eine Infektion von Javaneraffen aus der Gattung der Makaken einen ähnlichen Krankheitsverlauf festzustellen und dann den Erreger wiederum im Wirt nachzuweisen.^[49, 50]

Coronaviren (Klasse *Nidovirales*, Familie *Coronaviridae*, Genus *Coronavirus*) sind umhüllte Einzel-Plus-Strang RNA-Viren, deren Replikation im Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt.^[51, 52] Diese Virenfamilie weist bislang das längste virale RNA Genom mit 27 bis 31 Kilobasen auf.^[52, 53]

Am häufigsten werden durch Coronaviren Erkältungskrankheiten oder auch gastrointestinale Infekte verursacht.

Die Familie der Coronaviren lässt sich in drei Gruppen unterteilen: Gruppe 1 und 2 weisen dabei Viren auf, die Säugetiere betreffen, während Gruppe 3 nur Coronaviren umfasst, die Vögel betreffen. Innerhalb dieser Gruppen werden die Viren unter anderem nach dem Aufbau ihres Genoms oder auch dem Wirt typisiert.^[52]

Coronaviren lassen sich bei vielen Tierarten, aber auch beim Menschen finden. Aus dem Bereich der humanen Coronaviren lassen sich HCoV-229E der Gruppe 1 und HCoV-OC43 der Gruppe 2 der Coronaviren zuordnen.^[52]

Im SARS-Coronavirus wurde ein neuer Typus eines humanen Coronavirus gefunden, der nach phylogenetischen Studien Ähnlichkeiten zur Gruppe 2 der Coronaviren aufweist.^[54] Inwieweit man das SARS-Coronavirus tatsächlich dieser Gruppe zuordnen kann, oder ob es sich hier um eine neue Gruppe von Coronaviren handelt, wird diskutiert.

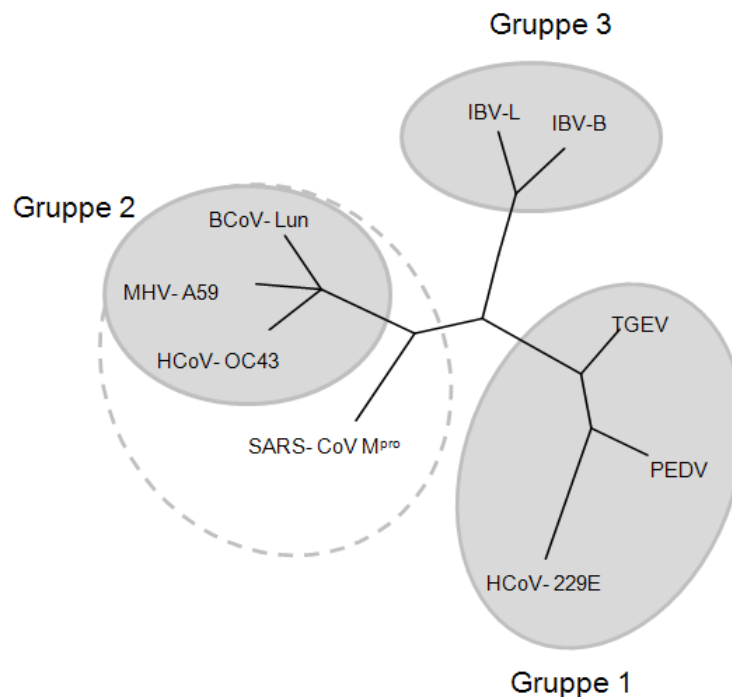


Abbildung 1.6: Phylogenetik der Coronaviren nach Snijder et al.^[54]

IBV= Infectious Bronchitis Virus, TGEV= Transmissible Gastroenteritis Virus, PEDV= Porcine Epidemic Diarrhea Virus, HCoV= Human Coronavirus, MHV= Mouse Hepatitis Virus, BCoV= Bovine Coronavirus

Aufgrund der Tatsache, dass die Krankheiten, die beim Menschen durch Erreger der Coronaviridae ausgelöst werden, bis dato einen eher milden Verlauf aufwiesen, wurde vor Ausbruch der SARS den Coronaviren relativ wenig Interesse entgegengebracht.^[55, 56] Dies änderte sich nach der SARS Pandemie. Bis Dezember 2008 wurden 16 neue Coronaviren bei Mensch und Tieren entdeckt.^[57]

Auf der Suche nach dem Ursprung dieses neuartigen Coronavirus wurden auch Untersuchungen im Tierreich durchgeführt. Da nach Fouchier et al.^[49] sowie Kuiken et al.^[50] ein ähnlicher Krankheitsverlauf nach Exposition von SARS-CoV bei Javaneraffen aus der Gattung der Makaken festgestellt wurde, ließ dies die Vermutung zu, dass bestimmte Tierarten die eigentlichen Wirte dieses neuen Coronavirus sind und eine Übertragung von Tier zu Mensch zur Pandemie führte.^[58] Des Weiteren sprach für diese These, dass die ersten Fälle von SARS hauptsächlich bei Nahrungshändlern und Restaurantarbeitern in der Provinz Guangdong beobachtet wurden.^[56] Um weiteren Übertragungen entgegenzuwirken, wurden verschiedene Schlacht- und Wildtiere in der Provinz Guangdong hinsichtlich des Vorkommens von Coronaviren untersucht. Dabei wurde das Virus vor allem bei dem in China als Delikatesse bekannten Larvenroller, *Paguma larvata*, gefunden.^[58] Ebenso wurde in der chinesischen Hufeisennase, *Rhinolophus sinicus*, einer Fledermausart, ein verwandtes

Coronavirus entdeckt.^[59] Es erschien somit möglich, dass ein eigentlich zoonotisches Coronavirus über einen Spezieswechsel auf den Menschen überging.^[60] Nach diesem Spezieswechsel erfolgte dann die erfolgreiche Mensch-zu-Mensch-Übertragung. Es ist nicht gänzlich ausgeschlossen, dass sich dieser Ablauf der Übertragung unter möglichem Wechsel der Spezies gegebenenfalls in Zukunft, wenn auch nicht in diesem Ausmaße wie bei der Pandemie 2002/03, nochmalig ereignen könnte.^[47] Daher ist es auch nach der Pandemie von Bedeutung die Ursache der Krankheit genau zu betrachten und weitere Therapieoptionen zu entwickeln.

Die Struktur des SARS-CoV weist folgende Merkmale auf (Abbildung 1.7):

RNA und Nukleokapsidproteine bilden eine helikale Struktur aus. Die Hülle enthält Membranglykoproteine, „Envelope“ Proteine sowie „Spike“ Glykoproteine. Letztere spielen eine wichtige Rolle im Replikationszyklus des SARS-CoV. Die Spike Glykoproteine binden an die Rezeptoren der Wirtszelle, es kommt zur Fusion der Virushülle mit der Membran der Wirtszelle, die Hülle wird entfernt und das virale RNA-Genom wird in das Zytoplasma der Zelle eingeschleust.^[28, 61]

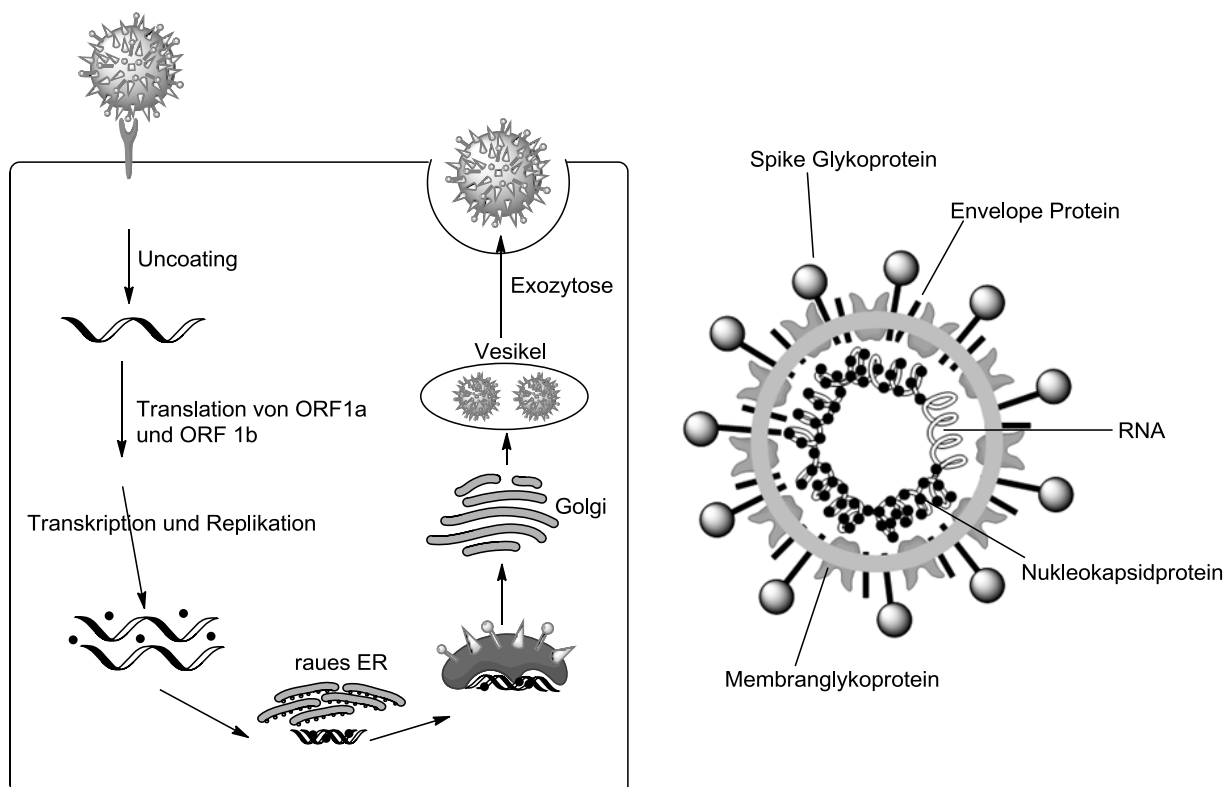


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Lebenszyklus eines Coronavirus nach Stadler et al.^[28], Schematischer Aufbau eines SARS-CoV nach Holmes et al.^[62]

Das Genom des SARS-Coronavirus besteht aus ca. 29700 Nukleotiden und weist 14 offene Leserahmen (ORFs, open reading frames) auf, die insgesamt für 28 Proteine kodieren.^[52, 54, 55, 61, 63]

Dabei umfassen die beiden langen ORFs, 1a und 1b, die Gene, die für jene Proteine kodieren, welche essentiell für die Synthese von RNA sind. Die restlichen ORFs sind für die Bildung der vier Strukturproteine E (=Envelope Protein), M (=Membranprotein), N (=Nukleokapsidprotein) und S (=Spike Protein) sowie weitere acht zusätzliche Proteine verantwortlich.^[61]

Da es sich beim Genom um eine Plusstrang-RNA handelt, und dies einer messenger RNA (mRNA) entspricht, kann diese sofort in der Wirtszelle translatiert werden. Im ersten Schritt der Translation werden die Polyproteine pp1a und pp1ab gebildet. Dabei wird über einen ribosomalen „frameshift“, über den ORF 1a und ORF 1b verbunden sind, die Translation der beiden Polyproteine sowie deren Verhältnis reguliert.^[64]

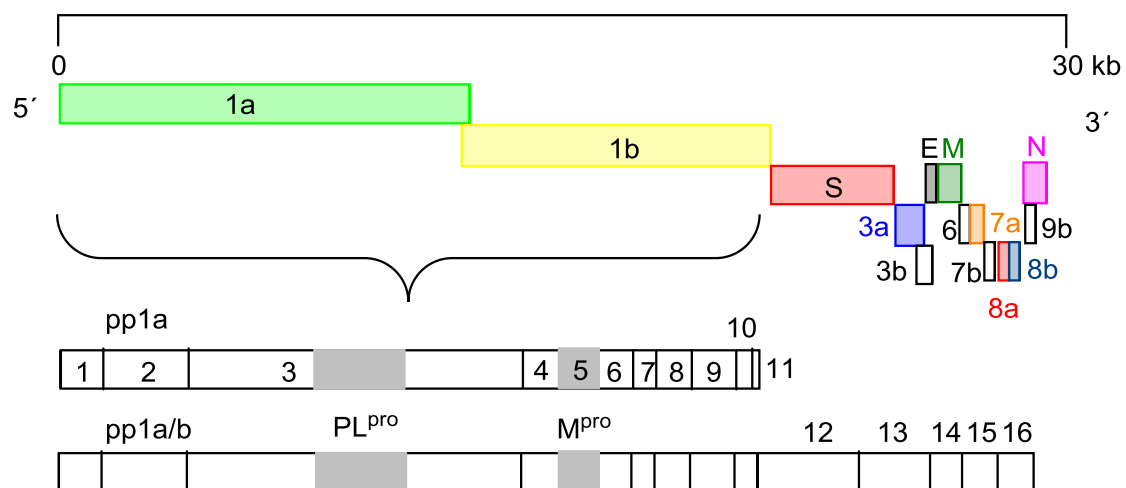


Abbildung 1.8: SARS-CoV Genom nach Thiel et al.^[63]

Die erhaltenen Polyproteine pp1a und pp1ab werden anschließend in 16 nichtstrukturelle Proteine (nsp) geschnitten. Diese Aufgabe wird im Gegensatz zu anderen Coronaviren, die dafür drei Proteasen besitzen, lediglich von zwei Proteasen übernommen: einer Papain-ähnlichen Protease (PL^{pro}) (nsp3) und einer Hauptprotease (M^{pro}) (nsp5), die auch als 3CL^{pro} bezeichnet wird.^[55]

Die SARS-CoV PL^{pro} ist dabei an drei Schnittstellen aktiv, während die SARS-CoV M^{pro} an 11 Schnittstellen wirksam wird und damit den Großteil der proteolytischen Aufgaben erfüllt.

Durch die Proteasen werden unter anderen nichtstrukturellen Proteinen eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Rep) und eine Adenosintriphosphat-Helicase freigesetzt, die für die Replikation der RNA verantwortlich sind.^[65]

Die Polymerase bildet anschließend unter Vorlage der Plusstrang-RNA, Minusstrang-RNA aus. Diese dient als Matrize für die Synthese von Plusstrang-RNA für die Virusvermehrung. Zusätzlich wird durch eine diskontinuierliche Transkription subgenomische Minusstrang-RNA gebildet.

Die neugebildete Plusstrang-RNA bildet mit dem Nukleokapsidprotein (N) im Zytoplasma das helikale Nukleokapsid aus. Die Hülle des Virus wird bei der Passage des helikalen Nukleokapsids durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat gebildet.^[28, 65] Letztlich werden die neugebildeten Viren über Exozytose aus der Wirtszelle ausgeschleust.

Aus dem Replikationszyklus des Virus ergeben sich verschiedene Ansätze für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen SARS. Zum einen kann in Betracht gezogen werden die Interaktion des Virus mit den Rezeptoren der Wirtszelle zu verhindern, wie beispielsweise bei der Entwicklung von Inhibitoren der HIV-1 vorgegangen wird. Als ein wichtiger Rezeptor für das SARS-CoV hat sich das Angiotensin Converting Enzym 2 (ACE 2) in Zellen der Lunge herausgestellt.^[66] Somit kann die Metalloprotease ACE 2 als ein Angriffspunkt in der Entwicklung von Arzneistoffen gegen SARS angesehen werden.

Zum anderen stellen die Proteasen, die für das Schneiden der Polyproteine verantwortlich sind, interessante Targets für die Wirkstoffsuche dar.^[62]

1.4.5 SARS-CoV Hauptprotease (SARS-CoV M^{pro})

Als ein mögliches Target für die Entwicklung von Arzneistoffen gegen SARS kann die SARS-CoV Hauptprotease (SARS-CoV M^{pro}) dienen. Aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit betreffend der Substratspezifität zu den 3C-Proteasen der Picornaviridae, wird diese auch als 3CL^{pro}, 3C-(„like“) ähnlich, bezeichnet.^[53]

Die erste Kristallstruktur wurde von Yang et al.^[67] in Verbindung mit einem substratanalogen Chloromethylketon-Inhibitor publiziert.

Demnach war zu erkennen, dass die Protease ein Homodimer mit zwei Protomeren, die rechtwinklig zueinander angeordnet sind, ausbildet.^[67] Jedes Protomer besteht aus drei Domänen. Die Domänen I und II weisen je sechs antiparallele β -Faltblätter auf und ähneln damit im starken Maße nicht nur der Struktur anderer Coronavirusproteasen sondern auch der Trypsin-ähnlicher Serinproteasen.^[67] Aufgrund der Chymotrypsin-artigen Struktur ist auch die Bezeichnung Chymotrypsin-ähnliche Protease geläufig. Domäne III umfasst ein antiparalleles Cluster von fünf α -Helices und ist über einen Loop mit Domäne II verbunden.

Während Domäne I und II an der Katalyse beteiligt sind, ist die biologische Funktion der dritten Domäne unklar.^[68]

Das aktive Zentrum der SARS-CoV M^{pro} liegt zwischen den Domänen I und II und besteht aus einem Cystein 145- und einem Histidin 41-Rest. Dabei ist zu beachten, dass die beiden Reste im Gegensatz zu anderen Cysteinproteasen, wie z.B. Papain, nicht als Thiolat und Imidazolium vorliegen.^[43] Ebenso ergibt sich über das aktive Zentrum auch ein Unterschied zu den 3C-Proteasen der Picornaviridae. Im Gegensatz zu diesen Proteasen handelt es sich hier lediglich um eine katalytische Diade, während die 3C-Proteasen eine dritte Aminosäure in die Katalyse einbeziehen.^[68] Für die Enzymaktivität ist es zwingend notwendig, dass die SARS-CoV M^{pro} als Dimer vorliegt. Für die Dimerisierung ist die Interaktion von Domäne III zu Domäne II zweier Protomere von essentieller Bedeutung ebenso wie die Interaktion des sogenannten „N-Fingers“, einer Reihe von N-terminalen Aminosäuren (Reste 1-7), die im Bereich zwischen Domäne III desselben Protomers und Domäne II des zweiten Protomers zum Tragen kommt.^[67, 69, 70, 71]

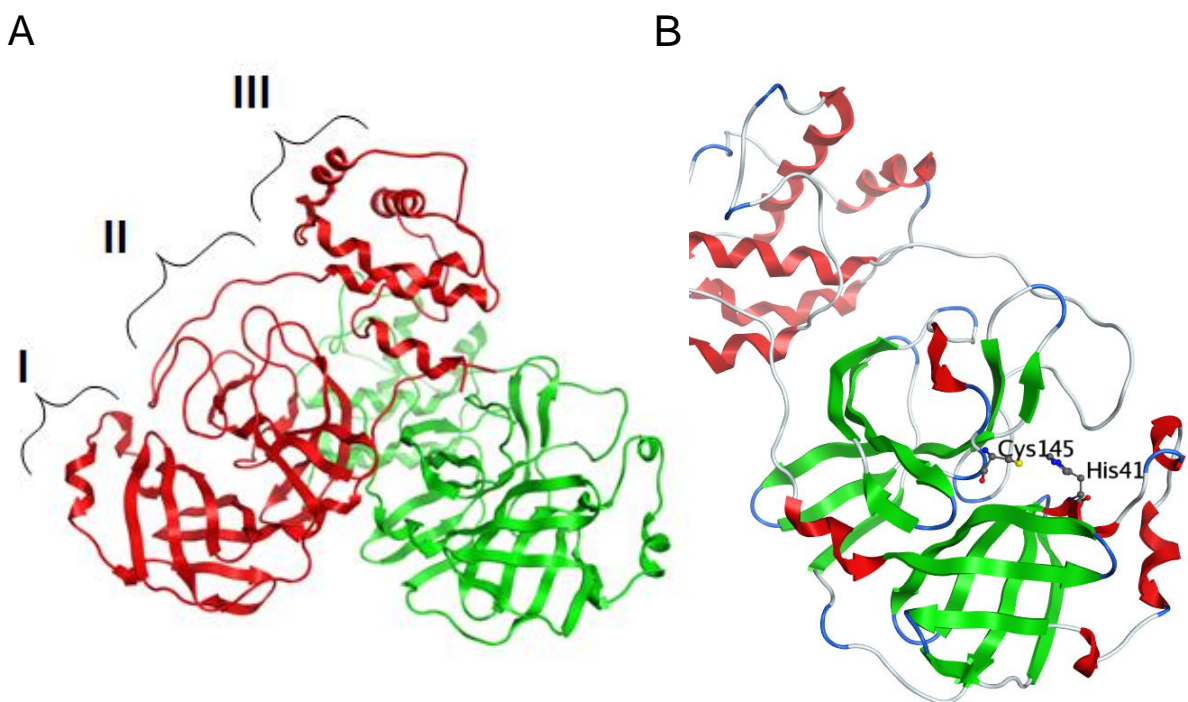


Abbildung 1.9: Kristallstruktur der SARS-CoV Hauptprotease (pdb: 1UJ1) (A Darstellung als Dimer, B Darstellung eines Protomers (rot: helices, grün: β-Faltblätter) unter Angabe des aktiven Zentrums)

Die SARS-CoV M^{pro} (nsp5) übernimmt nach erfolgter Autoproteolyse aus dem Polyprotein pp1a bzw. pp1ab den Großteil der Proteolyse der Polyproteine, indem sie an 11 Schnittstellen aktiv wird. Dabei ist die folgende Schnittsequenz erforderlich: Leu-Gln|| (Ser, Ala, Gly).^[53] Anhand der Schnittsequenz lassen sich einige Präferenzen für gewisse

Aminosäuren an den verschiedenen Positionen ablesen. So wird an Position P_1 ausschließlich Glutamin akzeptiert, an P_2 werden große hydrophobe Reste bevorzugt wie beispielsweise Leucin oder auch Isoleucin, Tyrosin, Valin, Methionin oder Phenylalanin, während an P_4 Serin, Valin, Threonin oder Prolin möglich sind.^[72] An P_1' sind verschiedene kleinere Reste erforderlich wie Serin, Alanin, Glycin, Asparagin oder auch Cystein. Dabei lässt sich feststellen, dass Serin am häufigsten auftritt. Alle weiteren Positionen, P_2' bis P_4' weisen keinerlei Präferenzen auf.^[10, 72]

Diese Kenntnisse werden sowohl in der Gestaltung synthetischer Substrate wie auch der Entwicklung von spezifischen Inhibitoren genutzt.

1.4.6 Inhibitoren der SARS-CoV Hauptprotease

Die Entwicklung von Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} kann über unterschiedliche Strategien erfolgen. Zum einen mit der Betrachtung der nativen peptidischen Substrate der Protease.^[73] Über die Nachahmung der Sequenz des nativen Substrates (P_1 - P_6 bzw. P_1 - P_8) in Kombination mit einer reaktiven elektrophilen Kopfgruppe (*warhead*) wurde eine Vielzahl von peptidomimetischen Inhibitoren von verschiedenen Arbeitsgruppen synthetisiert und getestet. Ein effektiver Inhibitor der M^{pro} , der nach Yang et al.^[67] zu den besten Ergebnissen in der Erstellung einer Kristallstruktur geführt hat, ist das Cbz(Benzyloxycarbonyl)-Val-Asn-Ser-Thr-Leu-Gln-CMK(Chloromethylketon).

Der Chloromethylketonrest bindet kovalent an das Cystein des aktiven Zentrums. Neben dem Chloromethylketonrest sind als solche klassischen Kopfgruppen bei Cysteinproteasen zumeist folgende Reste vertreten: Trifluoromethylketone^[74], Diazoverbindungen, Epoxide, Aziridine^[73], Aldehyde oder auch α,β -ungesättigte Verbindungen wie Vinylketone.^[75]

Ein weiterer Ansatz, der für die Suche nach niedermolekularen Verbindungen als Inhibitoren der Protease häufig genutzt wird, besteht im Screening von Substanzbibliotheken, die eine Vielzahl von bereits bekannten und diversen Strukturen aufweisen. Mit Hilfe einer geeigneten Kristallstruktur kann über Dockingstudien eine Vorauswahl aus diesen Substanzbibliotheken getroffen werden.^[76] Ebenso kann über einen bereits als potent verifizierten Inhibitor, eine Ähnlichkeitssuche in solchen Substanzbibliotheken zum Ziel führen.^[77] Die besten Substanzen werden dann in einem High Throughput Screening getestet.^[78]

Durch Dockingstudien großer Substanzbibliotheken wurden so als erste nichtpeptidische Inhibitoren unter anderem Ribavirin sowie Lopinavir und Ritonavir gefunden.^[79] Diese Wirkstoffe wurden bereits in der Therapie der SARS angewandt (siehe Kapitel 1.4.3).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl von potenziellen niedermolekularen Inhibitoren publiziert, die auf Basis ähnlicher Strategien und aufbauend auf Strukturen

wirksamer Inhibitoren gefunden wurden. Zu vielversprechenden Inhibitoren gehören beispielsweise die Gruppe der Isatine, die bereits an 3C-Proteasen gute Hemmwirkungen zeigten ^[80], Anilide ^[81], Cinanserin ^[82], Etacrynsäurederivate ^[83] sowie viele weitere niedermolekulare Verbindungen.

1.5 Die Serinprotease Chymotrypsin

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der SARS-CoV M^{pro} zur Serinprotease Chymotrypsin, soll diese im Folgenden charakterisiert werden:

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1 bzw. S01.152) gehört zu den Verdauungsenzymen im menschlichen Körper. Die 25 kDa schwere Protease besteht aus drei Polypeptidketten.^[84] Chymotrypsin gliedert sich in zwei Domänen, die jeweils sechs antiparallele β -Faltblätter aufweisen. Wie bereits in Kapitel 1.4.5 erwähnt, ist damit eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen Domäne I und II der SARS-CoV M^{pro} bzw. dem Aufbau von 3C-Proteasen und den genannten beiden Domänen des Chymotrypsins gegeben.^[67, 85]

Als Vorstufe des Chymotrypsins wird im Pankreas das Chymotrypsinogen gebildet. Dieses wird unter proteolytischer Aktivität von Trypsin zum π -Chymotrypsin geschnitten. Nach autoproteolytischer Aktivität dieser Form des Chymotrypsins wird als weitere stabile Form das α -Chymotrypsin gebildet.^[86]

Das aktive Zentrum des Chymotrypsins weist eine katalytische Triade auf, bestehend aus Serin 195, Histidin 57 und Aspartat 102.^[84] Dabei übt das Aspartat ähnlich wie das Asparagin bei den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen eine stabilisierende Funktion auf den Übergangszustand und die Orientierung des Histidins aus.^[84]

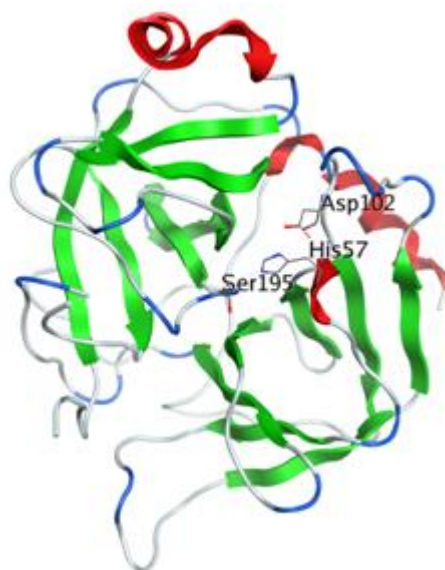


Abbildung 1.10: Kristallstruktur von Chymotrypsin (pdb: 4CHA, Bos taurus), Darstellung einer Kette unter Angabe des aktiven Zentrums

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, einen Arbeitsablauf für fluorimetrische Protease-Assays zu etablieren, um positive Hits von falsch Positiven eindeutig unterscheiden zu können. Dieser Arbeitsablauf sollte dabei dazu dienen, eine geeignete Leitstruktur für die weitere Suche nach nichtpeptidischen und spezifischen Inhibitoren für die SARS-CoV M^{pro} zu finden. Der Fokus lag dabei besonders auf der Suche nach nichtpeptidischen Inhibitoren, die keine kovalente Bindung zur Protease ausbilden und die einen reversiblen, kompetitiven Hemmmechanismus aufweisen. Irreversible Inhibitoren müssen aufgrund ihres Wirkmechanismus reaktiv sein. Daher ist es bei diesen Inhibitoren von großer Bedeutung eine hohe Selektivität zur Zielstruktur zu entwickeln, um Toxizität zu vermeiden. Dieser Aspekt gestaltet sich oftmals problematisch, daher sollte der Fokus auf den reversiblen Inhibitoren verbleiben. Zudem waren zu Beginn der Arbeit bereits einige kovalente Inhibitoren mit klassischen Kopfgruppen bekannt, sodass hier keine großen Innovationen zu erwarten waren.

Entwicklung des Arbeitsablaufs

Zunächst sollte erarbeitet werden, welche Prozesse bei fluorimetrischen Protease-Assays zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Für jede Ursache falsch positiver Ergebnisse sollte anschließend eine möglichst einfache Methode etabliert werden, um Artefakte eindeutig zu detektieren. Die Methoden sollten dabei so gewählt werden, dass die Bedingungen eines entwickelten Standardassays erhalten bleiben und die gemessene Inhibition mit einfachen Mitteln korrigiert werden kann. Über die einzelnen Schritte des entwickelten Arbeitsablaufs sollte es abschließend möglich sein, eine genaue Aussage darüber zu treffen, ob eine tatsächliche Hemmung der Protease durch den getesteten Inhibitor oder ein falsch positives Ergebnis vorliegt. Im Falle einer tatsächlichen Inhibition sollten des Weiteren Assayschritte eingebunden werden, die einer Klärung und Charakterisierung des Hemmmechanismus dienen.

Der Arbeitsablauf sollte exemplarisch anhand der Cysteinprotease Cathepsin B und der Serinprotease Chymotrypsin entwickelt und erprobt werden. Dabei sollte Cathepsin B als Prototyp einer Cysteinprotease dienen, die bislang eine gute Stabilität und einfache Handhabung im Assay gezeigt hat. Chymotrypsin sollte aufgrund seiner Ähnlichkeit zur SARS-CoV M^{pro} getestet werden.

Hitvalidierung von bereits publizierten SARS-CoV M^{pro}-Inhibitoren

Der Arbeitsablauf sollte nach der erfolgreichen Erprobung an Cathepsin B und Chymotrypsin auf das eigentliche Target, die SARS-CoV M^{pro} übertragen werden, um so eine Hitvalidierung bereits publizierter Inhibitoren durchführen zu können. Dabei stand vor allem die

Verifizierung von explizit nichtkovalenten Inhibitoren im Vordergrund bzw. die Prüfung von Inhibitoren mit niedrigen Hemmkonstanten bei denen in den Originalpublikationen keine Angaben zur Art der Kinetik gemacht wurden.

Die Ergebnisse sollten dabei ein Ausgangspunkt für die Suche nach einer geeigneten Leitstruktur sein.

Selektivitätstestungen an möglichst diversen Cysteinproteasen

Des Weiteren sollten Cysteinproteasen, die hinsichtlich ihrer Bindetasche eine möglichst große Diversität aufweisen, gewählt werden. Für diese Proteasen sollten fluorimetrische Assays entwickelt werden, die auf dem erarbeiteten Arbeitsablauf aufbauen.

Somit sollte die Möglichkeit gegeben sein, Inhibitoren einer Selektivitätstestung an verschiedenen Targets aus dem Bereich der Cysteinproteasen zu unterziehen.

Zum einen sollte so geprüft werden, inwieweit ein Inhibitor der SARS-CoV M^{pro} auch andere Cysteinproteasen aus verschiedenen Familien hemmt, zum anderen sollte aufgezeigt werden, wie sich falsch positive Hits an diesen unterschiedlichen Targets bei den unterschiedlichen Assaybedingungen manifestieren.

3 Enzymassay

3.1 Einleitung

Enzyme katalysieren viele wichtige Reaktionen, bei denen ein Substrat in ein bestimmtes Produkt umgesetzt wird. Damit stellen sie bedeutsame Targets in der Arzneistoffentwicklung dar. Dabei steht vor allem die Interaktion möglicher Inhibitoren mit den betrachteten Enzymen im Vordergrund. Um die Wirksamkeit von Substanzen an diesen Targets zu testen, gibt es zahlreiche Möglichkeiten Assays zu gestalten. Dabei können zum einen die Zunahme des Produktes und zum anderen die Abnahme des Substrates über einen definierten Zeitraum als Basis der Methode dienen. Für die direkte Detektion des Produktes bzw. des restlichen Anteils an Substrat können beispielsweise spektrometrische, chromatographische, elektrophoretische oder auch immunologische Methoden herangezogen werden. Man unterscheidet dabei in direkte, indirekte und gekoppelte Assays.^[87] Bei direkten Assays ergibt sich der Definition nach sofort ein detektierbares Signal aus der Umsetzung des Substrates am Enzym. In den beiden anderen Fällen sind zusätzliche Reaktionen neben der Umsetzung des Substrates von Nöten, um ein Signal zu erhalten. Die Entwicklung von Enzymassays beinhaltet jedoch nicht nur die Art der Visualisierung der enzymatischen Reaktion. Vielmehr spielt die Wahl der Bedingungen eine große Rolle, um einen validen Assay zu etablieren, der möglichst keine falsch positiven sowie falsch negativen Ergebnisse zulässt.^[88] Dazu ist es von Bedeutung einige Variablen innerhalb der Entwicklung des Assays genauer zu betrachten. Dazu gehören nicht nur die Wahl der Enzym- und Substratkonzentrationen sondern auch Parameter wie der pH-Wert des Ansatzes, die Temperatur bei der Durchführung der Messung, die Viskosität des Mediums, die Ionenstärke oder auch die DMSO-Konzentration im Assay.^[78, 89]

Ein valider Assay ist ein wichtiges Instrument im Rahmen der Entwicklung neuer Wirkstoffe. So wird es mit High Throughput Screenings (HTS) - vor allem mittels spektrometrischer Enzymassays - möglich, große Substanzbibliotheken auf Leitstrukturen hin zu untersuchen.^[78]

Im Folgenden soll zunächst die Enzymkinetik, die die Basis der Methoden bildet, näher beschrieben werden. Dabei steht vor allem im Fokus nach welchem Mechanismus Inhibitoren ein Enzym hemmen können. Des Weiteren sind die aus dem Assay bestimmbaren Hemmkonstanten von Inhibitoren von Interesse. Anschließend wird die Entwicklung von Protease-Assays im Einzelnen erläutert.

3.2 Enzymkinetik und Hemmkonstanten

Die Herleitung der Gleichungen der verschiedenen Enzymkinetiken erfolgt im gesamten Kapitel 3.2 nach Bisswanger ^[90], Copeland ^[87] und Smith ^[91].

Betrachtet wird zunächst die enzymatische (E) Umsetzung des Substrates (S) zum Produkt (P) in Abwesenheit von Inhibitoren (I):



Bei der Umsetzung gelten folgende Zusammenhänge:

$$\frac{dS}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (1)$$

$$\frac{dE}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (2)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_{cat}[ES] = v = \text{Produktzunahme} = \text{Umsatzgeschwindigkeit} \quad (4)$$

(mit E=Enzym, S=Substrat, ES=Enzym-Substrat-Komplex)

Der Enzym-Substrat-Komplex (ES) bleibt über einen gewissen Zeitraum stabil. Die Bildung sowie der Zerfall des Komplexes befinden sich dabei im Gleichgewicht. Daraus resultiert eine lineare Substratabnahme sowie Produktzunahme. Demnach kann die Umsetzung als Reaktion 0.Ordnung angesehen werden.

Damit gilt: $\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[E]}{dt} = 0$ und daraus: $k_1[E][S] = (k_{-1} + k_{cat})[ES]$ (5)

Außerdem gilt: $[E]_0 = [E] + [ES]$ (6)

($[E]_0$ = Gesamtmenge des Enzyms)

Eingesetzt folgt:
$$[ES] = \frac{(k_1 \cdot [S] + [E]_0)}{(k_1 \cdot [S] + k_{-1} + k_{cat})} \quad (7)$$

Mit $k_{cat} \cdot [ES] = v$ $k_{cat} \cdot [E]_0 = v_{max}$ sowie $\frac{(k_{-1} + k_{cat})}{k_1} = K_m$ (8)

ergibt sich daraus die Michaels-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

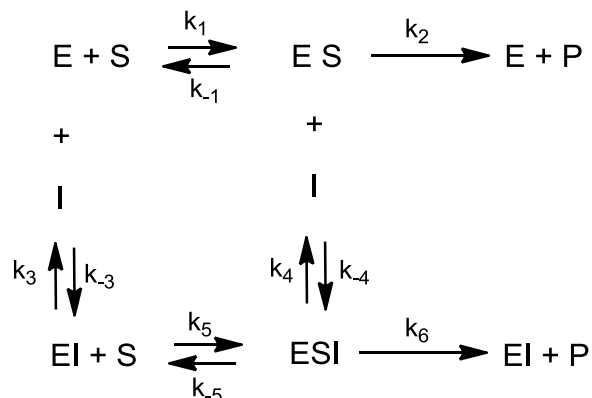
Dabei steht v für die Umsatzgeschwindigkeit, v_{max} für die maximale Umsatzgeschwindigkeit und K_m für die Michaelis-Menten-Konstante.

Für die Kinetik einer enzymatischen Reaktion sind zum einen der K_m -Wert, der das Maß der Affinität des Substrates zum betreffenden Enzym angibt, sowie k_{cat} , das die Geschwindigkeit der Substratumsetzung beschreibt, charakteristische Parameter.

Die Inhibitionsparameter richten sich nach der Art des Hemmmechanismus und werden in den nächsten Abschnitten eingehender charakterisiert.

3.2.1 Reversible Hemmmechanismen

Allgemein lässt sich folgendes Schema für alle Arten reversibler Hemmung formulieren:



Nach dem allgemeinen Schema ist zu ersehen, dass sich zwei Dissoziationskonstanten, einmal für den Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) (K_{i_komp} , kompetitive Hemmung) und einmal für

den Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (ESI) (K_{i_unkomp} , unkompetitive Hemmung), ergeben, die sich wie folgt berechnen lassen:

$$K_{i_komp} = \frac{k_{-3}}{k_3} = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (10) \quad \text{sowie} \quad K_{i_unkomp} = \frac{k_{-4}}{k_4} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (11)$$

Aus den Zusammenhängen des allgemeinen Schemas ergibt sich für die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit folgende allgemeingültige Gleichung:

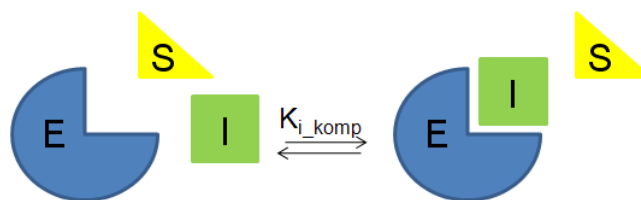
$$v = \frac{((v_{\max_1} + v_{\max_2} \frac{[I]}{K_{i_unkomp}}) \cdot [S])}{(K_m \cdot (1 + \frac{[I]}{K_{i_komp}}) + (1 + \frac{[I]}{K_{i_unkomp}}) \cdot [S])} \quad (12)$$

Dabei steht in dieser Gleichung v_{\max_1} für die maximale Umsatzgeschwindigkeit, die im Schema über Multiplikation von k_2 und der Gesamtkonzentration des Enzyms $[E]_0$ berechnet werden kann. Bei v_{\max_2} handelt es sich um eine zweite maximale Umsatzgeschwindigkeit, die sich aus dem allgemeinen Schema über die Multiplikation von k_6 und der Gesamtmenge des Enzyms $[E]_0$ ergibt.

Aus Gleichung (12) leiten sich die entsprechenden Terme für die unterschiedlichen Arten der reversiblen Hemmung ab. Man unterscheidet in kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Hemmung.

3.2.1.1 Kompetitive Hemmung

Im Falle einer kompetitiven Hemmung tritt der Inhibitor als Analogon zum Substrat auf und konkurriert mit diesem um dieselbe Bindestelle.



Aus dem allgemeingültigen Schema bleibt alleinig die Dissoziationskonstante K_{i_komp} bestehen, da die weiteren Reaktionswege herausfallen.

Damit ergibt sich für die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit folgende Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_komp}}\right) + [S]} \quad (13)$$

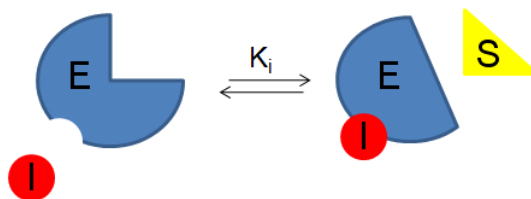
Eine kompetitive Hemmung des Enzyms bewirkt eine Veränderung des K_m -Wertes in Abhängigkeit von der Inhibitor- und der Substratkonzentration bei gleichbleibendem v_{\max} .

$$K'_m = K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_komp}}\right) \quad (14)$$

K'_m gibt demzufolge die durch Anwesenheit des Inhibitors veränderte Michaelis-Menten-Konstante an.

3.2.1.2 Nicht-kompetitive Hemmung

Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung sind beide Dissoziationskonstanten (K_{i_komp} und K_{i_unkomp}) aus dem allgemeinen Schema zu berücksichtigen.



Für die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit ergibt sich damit folgende Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{(K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_komp}}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_unkomp}}\right) \cdot [S]} = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{(K_m + [S]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (15)$$

Da im Falle einer „reinen“ nicht-kompetitiven Kinetik davon ausgegangen wird, dass der Inhibitor gleich stark an das freie Enzym (E) sowie an den Komplex aus Enzym und Substrat (ES) bindet, werden die Dissoziationskonstanten auf K_i reduziert.^[91]

Bei einer nicht-kompetitiven Kinetik steht der Inhibitor nicht in Konkurrenz mit dem Substrat zur Bindestelle. Daher bleibt der K_m -Wert gleich, während sich v_{\max} der Umsetzung verändert.

3.2.1.3 Unkompetitive Hemmung

Bei einer unkompetitiven Hemmung des Enzyms bleibt nach dem allgemeinen Schema lediglich K_{i_unkomp} als Inhibitionskonstante bestehen.

Daraus folgt für die Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{(K_m + (1 + \frac{[I]}{K_{i_unkomp}}) \cdot [S])} \quad (16)$$

Bei einer unkompetitiven Kinetik verändern sich beide Parameter, K_m und v_{\max} .

3.2.1.4 Berechnung von K_i aus den Umsatz-Zeit-Kurven

Die Auswertung der reversiblen Hemmung erfolgt hier über den Dixon-Plot ^[92]:

$$v_i = \frac{v_0}{(1 + \frac{[I]}{K_{iapp}})} \quad (17)$$

Dabei steht v_i für die Aktivität des Enzyms unter Zusatz des Inhibitors und v_0 für die Aktivität des Enzyms ohne Zusatz eines Inhibitors (=Blindwert). Mit K_{iapp} wird der scheinbare („apparente“) Wert für die Dissoziationskonstante K_i bezeichnet. Mit K_i wird hierbei jeweils die übriggebliebene Dissoziationskonstante aus K_{i_komp} und K_{i_unkomp} bezeichnet.

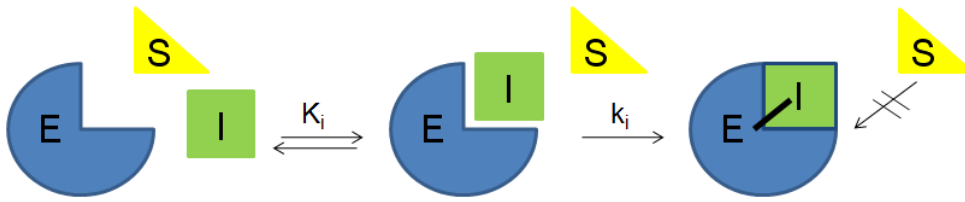
Die Aktivität wird über die Steigung der Gerade im Umsatz-Zeit-Diagramm ermittelt.

Trägt man $\frac{v_0}{v_i}$ gegen $[I]$ auf, so lässt sich der K_{iapp} -Wert reziprok aus der Steigung

berechnen. Es wird zunächst nur ein scheinbarer Wert für K_i , das sogenannte K_{iapp} , erhalten, da bei dieser Art des Vorgehens zunächst die Substratkonzentration vernachlässigt wird, um über eine Reaktion pseudoerster Ordnung die Parameter einfacher berechnen zu können. Um den wahren K_i -Wert zu erhalten, müssen die Substratkonzentration sowie die Affinität des Substrates zum Enzym mit berücksichtigt werden. Man erhält den wahren K_i durch Anwenden der folgenden Gleichung:

$$K_i = \frac{K_{iapp}}{(1 + \frac{[S]}{K_m})} \quad (18)$$

3.2.2 Irreversible Hemmmechanismen



Die Gesamtmenge des Enzyms setzt sich wie folgt zusammen:

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [E-I] = [E]_a + [E-I] \quad (19)$$

Dabei steht $[EI]$ für den Enzym-Inhibitor-Komplex, der noch keine kovalente Bindung aufweist. $[E-I]$ bezeichnet den inaktivierten Anteil des Enzyms und $[E]_a$ dementsprechend die noch aktive Form des Enzyms.

Unter der Voraussetzung, dass $[I] \gg [E]_0$ ergibt sich eine Reaktion pseudoerster Ordnung:

$$\frac{(d[E-I])}{dt} = \frac{(d([E]_0 - [E]_a))}{dt} = k_i [EI] \quad (20)$$

Mit k_i wird dabei die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion erster Ordnung, die zur Bildung des inaktivierten Enzyms $[E-I]$ führt, bezeichnet.

Bleibt die Gesamtmenge des Enzyms $[E]_0$ konstant (siehe Gleichung (19)), dann folgt:

$$\frac{-(d[E]_a)}{dt} = k_i [EI] \quad (21)$$

mit $K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$ und $[E]_a = [EI] + [E] = [EI] + \frac{[EI] \cdot K_i}{[I]}$ folgt:

$$\frac{(d[E]_a)}{dt} = \frac{k_i \cdot [E]_a}{(1 + \frac{K_i}{[I]})} \quad (22)$$

Die Integration von $[E]_0$ zur Zeit $t=0$ nach $[E]_a$ zur Zeit t ergibt (siehe Bisswanger, Enzyme kinetics, 2. Edition, S.97):

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = \frac{-k_i \cdot t}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad (23)$$

$$\text{Mit } \ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -k_{\text{obs}} \cdot t \text{ folgt: } k_{\text{obs}} = \frac{k_i}{\left(1 + \frac{K_i}{[I]}\right)} \quad \text{bzw. } k_{\text{obs}} = \frac{k_i \cdot [I]}{(K_i + [I])} \quad (24)$$

Diese Beziehungen gelten nur unter steady-state-Bedingungen, da hierbei die Abnahme des aktiven Anteils an Enzym einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Mit k_{obs} wird die Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung bezeichnet.

Die Berechnung der k_{obs} -Werte erfolgt über Messungen von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Anschließend werden k_i und K_i über eine nichtlineare Regression ermittelt. Aus dem Quotienten von k_i und K_i lässt sich dann die charakteristische Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, das $k_{2\text{nd}}$, berechnen:

$$k_{2\text{nd}} = \frac{k_i}{K_i} \quad (25)$$

Da auch hier für die Berechnung zunächst näherungsweise von einer Reaktion pseudoerster Ordnung ausgegangen wurde, erhält man vorerst einen scheinbaren Wert für K_i , das $K_{i\text{app}}$.

Dieser Wert kann ebenso wie bei der reversiblen Hemmung nach Gleichung (14) in den wahren K_i -Wert überführt werden.

3.3 Assay-Techniken

Für die Entwicklung von Enzymassays stehen verschiedene Strategien zur Verfügung. Im Folgenden sollen der kontinuierliche Assay sowie die Technik des Verdünnungsassays vorgestellt werden.

Ebenso gibt es unterschiedliche spektrometrische, chromatographische, elektrophoretische oder auch immunologische Methoden mit deren Hilfe über die Detektion der Zunahme des Produktes bzw. der Abnahme des Substrates die Enzymaktivität bestimmt werden kann. Aus dem Bereich der spektrometrischen Methoden soll im Folgenden die fluorimetrische Detektion und dabei insbesondere die Ausnutzung der Technik des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) dargestellt werden.

3.3.1 Kontinuierlicher Assay nach Tian und Tsou

Tian und Tsou ^[93] beschreiben einen kolorimetrischen Assay für die Bestimmung der Kinetik irreversibler Inhibitoren an α -Chymotrypsin. Bei der Methode der Autoren wird die Aktivität des Enzyms kontinuierlich bestimmt. Das bedeutet, der Reaktionsansatz wird gemischt und bei einer gewählten Detektionswellenlänge über einen definierten Zeitraum untersucht. Dabei ist die Produktzunahme das Kriterium der Detektion. So geben Tian und Tsou für die Berechnung der Inhibitionskonstante folgende Gleichung an:

$$[P_{\infty}] = \frac{V[S]K_m^{-1}}{(1 + [S]K_m^{-1})A[Y]} \quad (26)$$

$[P_{\infty}]$ steht dabei für die Produktkonzentration bei einer Zeit t gegen unendlich, A für die apparente Inhibitionskonstante, K_m^{-1} für die inverse Michaelis-Menten-Konstante, $[S]$ für die verwendete Substratkonzentration und $[Y]$ für die entsprechende Inhibitorkonzentration.

So kann bei Kenntnis von v_{\max} und K_m die Inhibitionskonstante direkt über $[P_{\infty}]$ ermittelt werden.

Aus dieser Grundgleichung **(26)** beschreiben Tian und Tsou die Berechnungen für die unterschiedlichen Enzymkinetiken.^[93]

3.3.2 Verdünnungsassay nach Kitz und Wilson

Bei der Assaymethode nach Kitz und Wilson ^[94], die ebenfalls für die Detektion irreversibler Inhibitoren erarbeitet wurde, wird das Enzym mit einem Vielfachen an Inhibitor inkubiert. Nach definierten Zeitabschnitten werden Proben genommen und ausgiebig verdünnt, um nichtkovalente Bindungen auszuschließen. Diese Proben werden anschließend mit Substrat versetzt, um die Restaktivität des Enzyms zu detektieren. Dabei steht die Hydrolyserate über den definierten Zeitraum für die Aktivität des Enzyms. Diese Methode hat den Nachteil, dass sie sehr zeitaufwendig ist, da die Prozedur mit möglichst vielen verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wiederholt werden muss, um die k_{obs} -Werte gegen die Inhibitorkonzentrationen auftragen zu können. Hier zeigt sich eine deutliche Zeitersparnis beim kontinuierlichen Assay.

3.3.3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Bei dem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, auch als Förster Resonanz Energie Transfer bezeichnet, handelt es sich um einen physikalischen Prozess der Energieübertragung, der durch Theodor Förster beschrieben wurde.^[95] Dabei wird ein

System betrachtet, das sich aus einem Fluoreszenzdonor und einem Fluoreszenzakzeptor zusammensetzt. Bei Anregung des Donors wird basierend auf einer Dipol-Dipol Wechselwirkung die Energie des Donors strahlungsfrei auf den Akzeptor übertragen. Für diesen Prozess sind bestimmte Kriterien zu erfüllen. Zum einen ist ein Molekülabstand von maximal 70 Å erforderlich und zum anderen müssen sich das Emissionsspektrum des Donors und das Anregungsspektrum des Akzeptors überlappen, damit der Energietransfer ermöglicht wird.^[95, 96, 97]

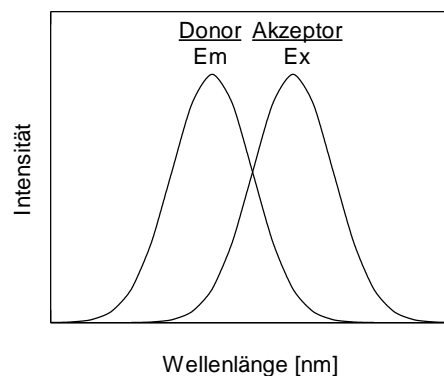


Abbildung 3.1: Überlappung des Emissionsspektrums eines Fluoreszenzdonors mit dem Extinktionsspektrum eines Fluoreszenzakzeptors

Das Ausmaß des Energietransfers lässt sich berechnen. Dazu wird der Abstand zwischen Donor und Akzeptor sowie das Ausmaß der Überlappung der Spektren herangezogen:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (27)$$

Dabei steht $k_T(r)$ für den Anteil des Energietransfers, R_0 für den Förster Abstand (Abstand zwischen Donor und Akzeptor bei dem der Energietransfer zu 50% wirksam wird), r für den Abstand zwischen Donor und Akzeptor sowie τ_D für die Fluoreszenzlebensdauer des Donors unter Fehlen des Energietransfers.^[97]

Das Prinzip dieses Energietransfers wird in verschiedenen Methoden angewendet. Zum einen kann es zum Messen von Abständen innerhalb von Proteinen genutzt werden. Dabei sollte die Größenordnung zwischen 10 und 60 Å liegen.^[96]

Zum anderen handelt es sich hierbei um eine Technik, die für die Entwicklung von Substraten von Hydrolasen für die Verwendung in fluorimetrischen Enzymassays angewandt werden kann.

3.4 Fluorimetrische Substrate

Es können zwei Arten von Substraten in fluorimetrischen Enzymassays verwendet werden. Zum einen verwendet man Peptide, die die erforderliche Schnittsequenz des betreffenden Enzyms aufweisen und an ihrem C-Terminus einen 7-Amino-4-methylcoumarinrest (AMC) aufweisen. Wird dieses Peptid durch die Protease geschnitten, wird dieser Rest freigesetzt und es kommt zur Fluoreszenz (Abbildung 3.2).

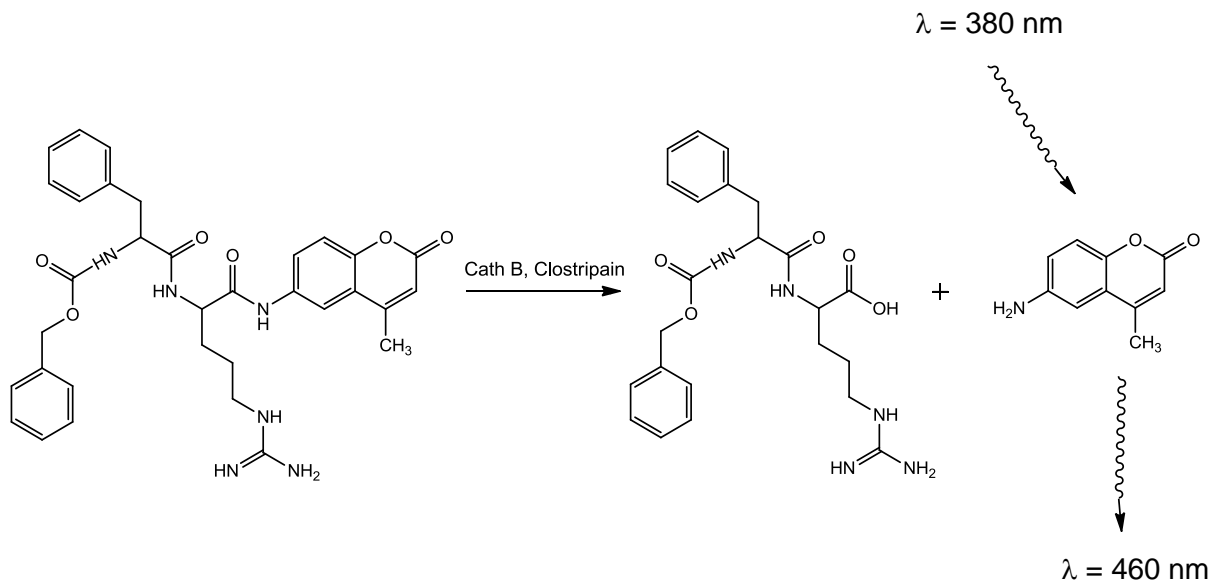


Abbildung 3.2: Hydrolyse des Z (=Benzyloxycarbonyl)-Phe-Arg-AMC Substrates

Eine weitere Möglichkeit bieten peptidische Substrate, die auf der FRET-Technik basieren. Dabei wird, wie unter 3.3.3 beschrieben, ein Fluoreszenzdonor mit einem Akzeptor über eine Aminosäuresequenz, die eine dem verwendeten Enzym entsprechende Schnittsequenz aufweist, gekoppelt. Im intakten, ungeschnittenen Zustand ist keine Fluoreszenz detektierbar. Wird das Substrat durch die entsprechende Protease geschnitten und Donor und Akzeptor liegen ausreichend weit voneinander entfernt vor, so lässt sich in Abhängigkeit von der Zeit eine Zunahme der Fluoreszenz messen.

Für die verwendeten Donoren und Akzeptoren gibt es je nach gewünschten Assaybedingungen verschiedene Möglichkeiten.^[98]

Ein mögliches Standardpaar ist zum Beispiel DABCYL-EDANS mit einer Anregungswellenlänge von 330-360 nm und einer Detektionswellenlänge von 490-538 nm.

Bei den Testungen an der SARS-CoV M^{pro} wurde hier eine Kombination aus o-Aminobenzoesäure (Abz) als Donor und Nitrotyrosin als Akzeptor verwendet (siehe Markierung im peptidischen Substrat, Abbildung 3.3). Dabei wurden eine Anregungswellenlänge von 325 nm und eine Detektionswellenlänge von 425 nm gewählt (Abbildung 3.3).

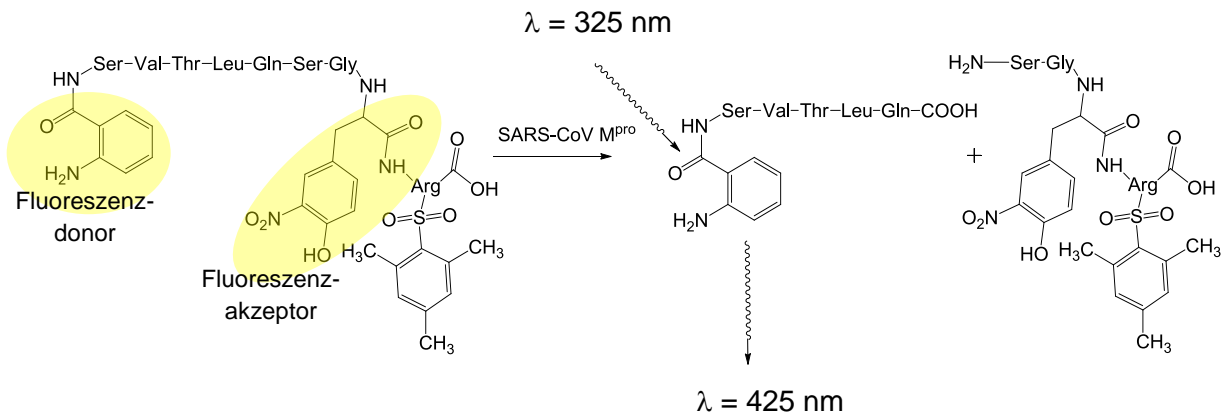


Abbildung 3.3: Hydrolyse des FRET-Substrates, das für den fluorimetrischen SARS-CoV M^{pro}-Assay verwendet wird

3.4.1 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m)

Die Michaelis-Menten-Konstante gibt die Affinität eines Substrates zum betrachteten Enzym an. Dabei wird K_m als die Konzentration des Substrates definiert, bei der die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion erreicht wird bzw. ist K_m die Konzentration bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist.^[87]

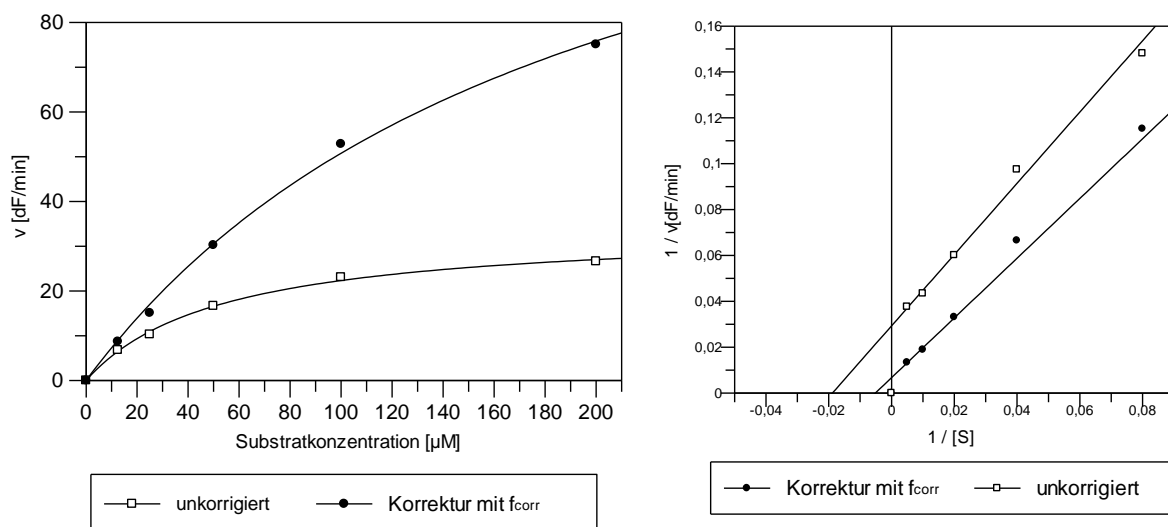


Abbildung 3.4: K_m -Wert des für die SARS-CoV M^{pro} verwendete FRET-Substrat

Bei der Bestimmung des K_m -Wertes von FRET-Substraten ist es von großer Bedeutung den inneren Filtereffekt zu berücksichtigen.^[99] In Abbildung 3.4 ist die Michaelis-Menten-Kinetik einmal für den unkorrigierten Wert und einmal für den korrigierten Wert dargestellt. Es lässt

sich deutlich eine Diskrepanz zwischen den beiden Werten erkennen. Da der K_m -Wert unter anderem zur Berechnung des K_i -Wertes herangezogen wird, ist es wichtig hier mögliche Fehlerquellen zu vermeiden.

Nach Korrektur des inneren Filtereffektes ergab sich ein K_m -Wert von ca. 190 μM für das im SARS-CoV M^{pro} Assay verwendete FRET-Substrat.

Für das im Cathepsin B-Assay verwendete AMC-Substrat wurde ein Wert von ca. 150 μM bestimmt (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: K_m -Werte von verwendeten Substraten

Substrat	K_m-Wert
Z-Phe-Arg-AMC * HCl	148 \pm 29,5 μM (am Cathepsin B)
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(NO₂)Tyr-Arg-(MTS),TFA	193 \pm 14,5 μM (SARS-CoV M ^{pro})

Das im SARS-CoV M^{pro}-Assay verwendete FRET-Substrat wurde zunächst in der Arbeitsgruppe Schirmeister synthetisiert ^[83], später von der Firma GenScript bezogen.

3.5 Durchführung der fluorimetrischen Enzymassays

Der fluorimetrische Enzymassay wird als kontinuierlicher Assay bei Raumtemperatur auf 96-„Well“-Mikrotiterplatten am Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer der Firma Varian durchgeführt (siehe experimenteller Teil). Die Assaybedingungen richten sich dabei je nach betrachtetem Enzym. Die Anregungs- und Detektionswellenlängen werden nach verwendetem Substrat eingestellt. Für AMC-Substrate beträgt die Anregungswellenlänge 380 nm und die Detektionswellenlänge 460 nm. Im Falle des FRET-Substrates für den SARS-CoV M^{pro}-Assay wird eine Anregungswellenlänge von 325 nm und eine Detektionswellenlänge von 425 nm gewählt.

Soweit nicht anders angegeben werden die Ansätze sofort nach dem Mischen ohne Inkubationszeit gemessen.

Die folgende Tabelle zeigt die Bedingungen für die verwendeten Enzymassays auf (ein ausführliches Assayprotokoll ist dem experimentellen Teil zu entnehmen):

Tabelle 3.2: Assaybedingungen für verschiedene Proteasen

Enzym	Assaybedingungen
Cathepsin B	50 mM Tris-Puffer pH 6,0 ¹⁾
	[E] = 1,05 nM (28,8 ng/ml)
	[S] = 40 µM
Chymotrypsin	50 mM Tris-Puffer pH 8,0 ²⁾
	[E] = 20 nM (500 ng/ml)
	[S] = 20 µM
SARS-CoV M^{pro}	20 mM Tris-Puffer pH 7,5 ³⁾
	[E] = 12,5 - 18,8 µg/ml
	[S] = 100 µM

¹⁾ 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl; im Enzymverdünnungspuffer zusätzlich 2,5 mM DTT, nach der Dissertation von Radim Vicik, Universität Würzburg

²⁾ 50 mM Tris-Puffer, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl

³⁾ 20 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 200 mM NaCl; im Enzymverdünnungspuffer zusätzlich 1 mM DTT, nach Kaeppler et al.^[83]

Die angegebenen Zusätze von EDTA und DTT im Puffer erfüllen bestimmte Funktionen. EDTA wird zugesetzt, um mögliche Schwermetallionen, die zu einer Denaturierung des Enzyms führen können, in der Lösung zu komplexieren.

Der Zusatz von DTT soll eine mögliche Disulfidbrücke am Cystein des aktiven Zentrums reduzieren und somit die vollkommene Enzymaktivität gewährleisten.

Die Messungen werden so durchgeführt, dass entweder verschiedene Inhibitoren bei der gleichen definierten Konzentration oder verschiedene Konzentrationen eines Inhibitors im Vergleich zu einem Blindwert, der die Enzymaktivität ohne Zusatz eines Inhibitors darstellt, getestet werden.

4 Erarbeitung eines Assay-Arbeitsablaufs am Beispiel von Cathepsin B und Chymotrypsin

In Kapitel 3.1 wurden Enzymassays bereits als wichtiges Instrument in der Wirkstofffindung beschrieben. Um einen validen Assay zu erstellen, spielt die genaue Kenntnis der optimalen Bedingungen eine große Rolle. Bei der Entwicklung eines geeigneten Assayprotokolls wird zunächst eine bestmögliche Methode für die Umsetzung des Substrates am Enzym entwickelt. Dabei wird die Enzymaktivität unter Veränderung von Versuchsbedingungen betrachtet. Ist eine Methode mit einem geeigneten Assaymedium bei geeigneter Temperatur, optimalen pH-Wert sowie geeigneten Enzym- und Substratkonzentrationen entwickelt, kann diese als Basis für die Testung verschiedener Inhibitoren dienen. Jedoch endet hiermit nicht die Validierung des Assays.

Bei der Messung der Inhibition sind noch weitere Parameter, wie die chemischen und physikalischen Eigenschaften der potenziellen Inhibitoren zu betrachten. Einige Eigenschaften wie eine schlechte Löslichkeit des Inhibitors im Assaymedium oder Absorptionseffekte können bei der Messung der Inhibition mittels eines fluorimetrischen Enzymassays zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Im folgenden Kapitel soll somit der Fokus auf die Eigenschaften der Testsubstanzen bzw. der potenziellen Inhibitoren gerichtet werden.

Zunächst wird dargestellt, welche chemischen und physikalischen Prozesse zu einem falsch positiven Testergebnis innerhalb eines fluorimetrischen Protease-Assays führen können. Im Fokus stehen dabei der innere Filtereffekt, die Aggregation sowie unspezifisch-kovalente Bindungen zwischen Enzym und Inhibitor.

Im Falle des inneren Filtereffektes werden Inhibitoren betrachtet, die im Bereich der Detektionswellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen und somit nur scheinbar die Umsetzung des Substrates am Enzym hemmen.^[100]

Bei der Aggregation bindet der potenzielle Inhibitor nicht spezifisch an das aktive Zentrum sondern bildet Aggregate aus, die sich unspezifisch an das betrachtete Enzym anlagern.^[101, 102]

Die einzelnen Effekte und ihre Auswirkungen werden im Folgenden näher erläutert.

Neben der Darstellung, welche Eigenschaften des Inhibitors zu falsch positiven Ergebnissen führen können, werden möglichst einfache Methoden aufgezeigt, die sich leicht mit Hilfe des Standardassays umsetzen lassen, um so unter möglichst gleichen Assaybedingungen die genannten Fehlerquellen aufdecken zu können.

Die Methoden zur Detektion möglicher Fehlerquellen sollten ebenso wie Messtechniken zur Art der Hemmung, reversibel oder irreversibel, zur Betrachtung von richtig positiven Inhibitoren, in einen Assay-Arbeitsablauf eingegliedert werden.

So sollte es nach Testung potenzieller Inhibitoren über einen entwickelten Arbeitsablauf für Cysteinprotease-Assays möglich sein, zwischen richtig oder falsch positiven Inhibitoren unterscheiden zu können. Ebenso sollten verlässliche Inhibitionsparameter im Falle richtig positiver Inhibitoren erhalten werden, um so entscheiden zu können, welche Testsubstanz als Leitstruktur für die weitere Wirkstoffsuche dienen kann.

Der angesprochene Assay-Arbeitsablauf sollte nach Erproben an Beispielenzymen auf das eigentliche Target, die SARS-CoV M^{pro}, übertragen werden (Kapitel 5).

Für die Entwicklung des Assay-Arbeitsablaufs wurde zunächst als Beispiel für eine Cysteinprotease das Cathepsin B gewählt. Um zusätzlich zu prüfen, ob der Ablauf auch für andere Proteasen anwendbar ist, wurde Chymotrypsin als Modell für eine Serinprotease ausgewählt. Die Verwendung dieser Protease erschien zudem aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur SARS-CoV M^{pro} sinnvoll.

In Abbildung 4.1 ist der erarbeitete Assay-Arbeitsablauf mit den verschiedenen Methoden zur Detektion falsch positiver Effekte sowie der Bestimmungsmöglichkeiten zur Art der Kinetik dargestellt.

Im Folgenden soll die Vorgehensweise bei den einzelnen Methoden näher erläutert werden.

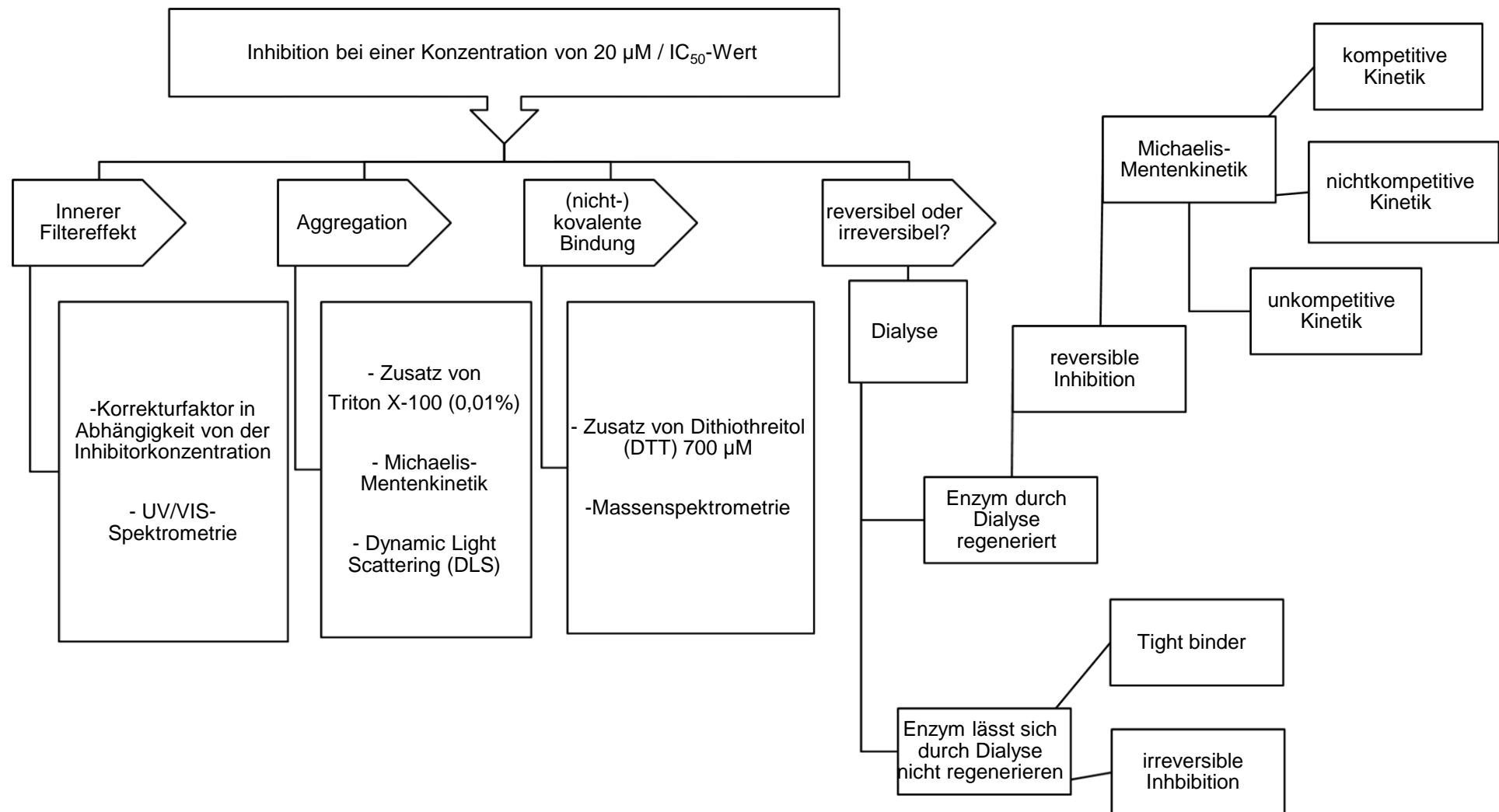


Abbildung 4.1: Erarbeiteter Arbeitsablauf für die Protease-Assays

4.1 Bestimmung der Inhibition in Prozent

Zunächst werden alle Testsubstanzen bei einer festen Konzentration auf ihre Inhibition [%] überprüft. So können Substanzen die bei der gewählten Konzentration keinerlei Hemmwirkung zeigen für weiterführende Messungen sofort verworfen werden. Diese Testungen werden zunächst bei einer Konzentration von 20 µM für die jeweiligen Inhibitoren durchgeführt. Frühere Testungen bei einer Inhibitorkonzentration von 100 µM zeigten, dass bei höherer Konzentration die Gefahr von Artefakten deutlich erhöht ist.

Nach Bestimmung der Inhibitionswerte lässt sich ungefähr abschätzen, in welchem Bereich sich der IC_{50} -Wert befindet. Demnach können die Inhibitorkonzentrationen für die weitere Bestimmung des IC_{50} -Wertes gewählt werden.

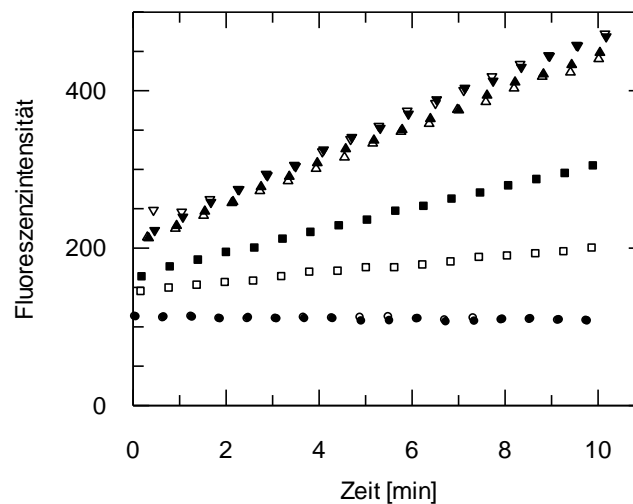


Abbildung 4.2: Fluoreszenzintensitätsänderung über der Zeit bei verschiedenen Inhibitoren im Vergleich zu einem Blindwert, der die Fluoreszenzintensitätsänderung über der Zeit (=Enzymaktivität) in Abwesenheit eines Inhibitors darstellt. Der Blindwert repräsentiert somit den Graphen mit der größten Steigung (schwarze kopfstehende Dreiecke).

In Abbildung 4.2 ist als Beispiel das Umsatz-Zeit-Diagramm einer Messung verschiedener Inhibitoren dargestellt. Die Steigung der Fluoreszenzintensität über die Zeit ist dabei ein Maß für die Restaktivität des Enzyms. Um die Inhibition [%] einer Substanz anzugeben, wird dazu nach folgender Gleichung vorgegangen:

$$\%Inh = 100 \cdot \left(1 - \frac{v_{roh}(c_{inh})}{v_{roh}(c_{inh} = 0)} \right) \quad (28)$$

Dabei steht $v_{roh}(c_{inh})$ für die Steigung, die für den jeweiligen Inhibitoransatz bestimmt wird und $v_{roh}(c_{inh}=0)$ für die Umsetzung des Substrates durch das ungehemmte Enzym (=Blindwert).

4.2 IC_{50} -Wert

Um die Stärke eines Inhibitors eingehender darzustellen, wird häufig der IC_{50} -Wert herangezogen. Dieser Wert gibt diejenige Inhibitorkonzentration an, bei der die Enzymaktivität auf 50% reduziert ist.^[87, 90] In den meisten Fällen ist es sinnvoller, hinsichtlich der Charakterisierung der Inhibitoren, Parameter wie k_i , K_i und k_{2nd} anzugeben, da diese eine viel stärkere Aussagekraft zum einen hinsichtlich der Art der Inhibition besitzen und zum anderen von den Bedingungen des durchgeführten Assays wie etwa der Substratkonzentration nicht in dem starken Ausmaß abhängig sind. Bei Unkenntnis der vorliegenden Kinetik sowie der Hemmstärke des Inhibitors lässt sich über den IC_{50} -Wert jedoch sehr schnell eine Aussage über das Ausmaß der Inhibition tätigen. Für die vorliegenden Testungen wurde der IC_{50} -Wert unter definierten Bedingungen als Vergleichsgröße herangezogen, da es vielmehr darum ging, welche Auswirkungen eine Variation der Versuchsbedingungen auf den IC_{50} -Wert hat. Dadurch, dass der IC_{50} -Wert immer unter den gleichen Bedingungen aufgenommen wurde, spricht dieselbe Enzym- und Substratkonzentration, ließ sich hier schon über mögliche Veränderungen dieses Parameters bei unterschiedlichen Korrekturmessungen eine Aussage über die Wertigkeit der getesteten Substanz als Inhibitor machen. Dazu wurde jeweils bei den Testungen auf eine Inkubationszeit verzichtet und somit die Messwerte sofort nach dem Pipettieren aufgenommen.

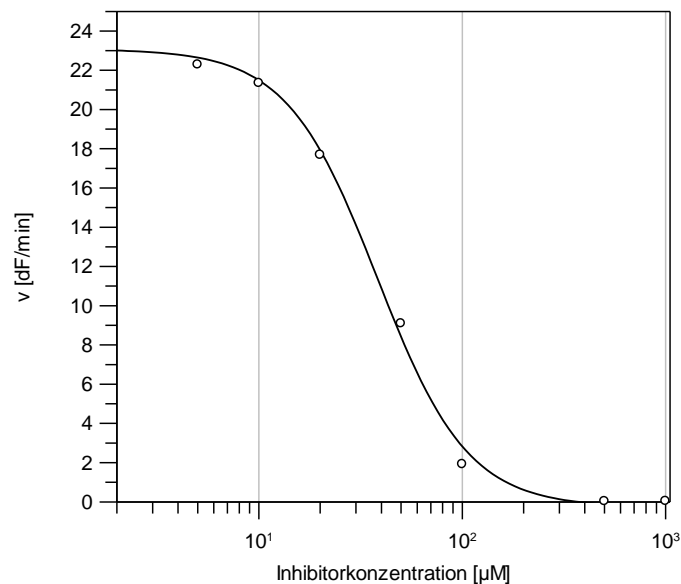


Abbildung 4.3: Beispiel einer IC_{50} -Kurve („Dosis-Wirkungs-Kurve“)

Aus der in Abbildung 4.3 dargestellten Kurve kann über folgende Gleichung der IC_{50} -Wert berechnet werden:

$$y = \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}} \right)^s} + y_{\min} \quad (29)$$

y steht dabei für die Aktivität des Enzyms bzw. das Ausmaß an Hydrolyse des Substrates durch das Enzym. Angegeben wird dieser Term als Fluoreszenzintensitätsänderung über die Zeit [dF/min]. y_{\max} und y_{\min} stellen den Maximal- bzw. Minimalwert der IC_{50} -Kurve dar, die bei niedrigen bzw. hohen Inhibitorkonzentrationen gemessen wurden. Der Exponent s im Nenner der Gleichung repräsentiert die Steilheit der Kurve. Bekannt ist dieser Parameter auch unter der Bezeichnung Hill-Koeffizient bei der allosteren Hemmung von Enzymen.^[100]

Wie bereits erwähnt, ist der IC_{50} -Wert ein guter Parameter, um unter definierten, gleichbleibenden Bedingungen die Hemmwirkung verschiedener Inhibitoren für ein Target zu vergleichen. Um den weitaus unabhängigeren Inhibitionsparameter K_i zu erhalten, kann dieser nach Cheng und Prusoff^[103] für kompetitive, nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibitoren bereits näherungsweise aus dem IC_{50} -Wert berechnet werden.

So ergibt sich K_i beispielsweise für einen kompetitiven Inhibitor aus dem erhaltenen IC_{50} -Wert wie folgt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (30)$$

4.3 Detektion falsch positiver Ergebnisse

Falsch positive Ergebnisse können unterschiedlicher Herkunft sein. Zum einen kann ein unberücksichtigter innerer Filtereffekt die Messwerte verfälschen, zum anderen kann die Aggregation eines Inhibitors dazu führen, eine Inhibition vorzutäuschen.

Im Folgenden sollen einige einfache Methoden aufgezeigt und charakterisiert werden, mit deren Hilfe solche falsch positiven Ergebnisse erkannt und korrigiert werden können.

4.3.1 Bestimmung des inneren Filtereffektes

Der innere Filtereffekt spielt nicht nur bei der Verwendung eines FRET-basierten Substrates eine Rolle. Vielmehr stellt dieser Effekt auch ein Problem bei der Bestimmung der exakten Inhibition potenzieller Inhibitoren dar. Einige der untersuchten Substanzen können unter den gegebenen Bedingungen in Lösung Licht der Wellenlänge absorbieren, bei denen der Fluorophor des Substrates Licht emittiert. Dadurch wird die detektierte Fluoreszenzintensität über die Zeit gemindert und so eine Hemmung des Enzyms vorgetäuscht. Dieser Effekt ist

abhängig von der Konzentration des Inhibitors, der Detektionswellenlänge und der Größe des Chromophors. Als Hinweis auf den inneren Filtereffekt dient bei der Messung eine große Differenz zwischen dem Ordinatenabschnitt der Messung für den Blindwert und der für den Inhibitor.

Es gibt eine Methode, mit deren Hilfe nicht nur der innere Filtereffekt detektiert werden kann, sondern auch ein Korrekturfaktor bestimmt werden kann, um den anschließend die Messwerte und damit auch die Inhibitionswerte korrigiert werden können. So lässt sich feststellen in welchem Ausmaß die getestete Substanz tatsächlich das betreffende Enzym inhibiert. Die Methode zur Bestimmung des inneren Filtereffektes soll im Folgenden vorgestellt werden:

Für die Testungen an Cathepsin B und Chymotrypsin werden Substrate mit einem 7-Amino-4-methylcoumarinrest verwendet. Um den Einfluss des inneren Filtereffektes zu verdeutlichen, wurde zunächst eine Substanz gesucht, die ein Absorptionsmaximum im Bereich der Wellenlänge des durch den freien Fluoreszenzdonor des Substrates (hier: AMC) emittierten Lichtes besitzt. Als Beispiel wurde deshalb Methylrot (MR) gewählt. Wie das UV-Spektrum in Abbildung 4.4 zeigt, absorbiert Methylrot im Bereich von 460 nm in starkem Maße.

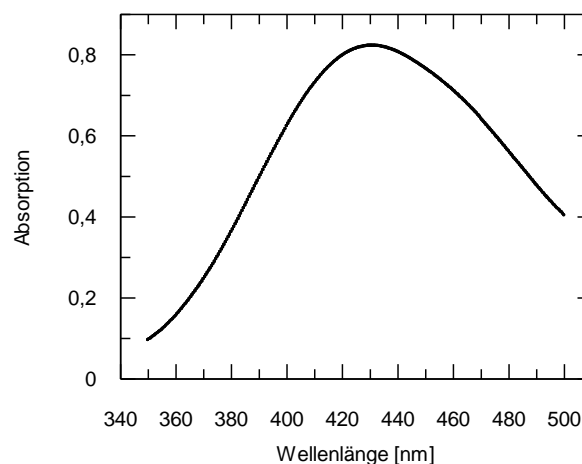


Abbildung 4.4: UV-Spektrum von Methylrot gelöst in DMSO

Um zu überprüfen, ob das Methylrot eine Inhibition vortäuscht, wurde die Substanz in Konzentrationen von 20 und 100 μM als Testsubstanz dem Cathepsin B-Assay zugesetzt. Im Umsatz-Zeit-Diagramm (Abbildung 4.5) ist zu erkennen, dass hier scheinbar eine deutliche Hemmwirkung vom Methylrot ausgeht. Die große Differenz zwischen dem Fluoreszenzeinheiten-Startpunkt des Blindwertes und dem der Inhibitoransätze lässt jedoch vermuten, dass hier eine starke Absorption der Emissionswellenlänge die Ursache für die scheinbare Inhibition ist.

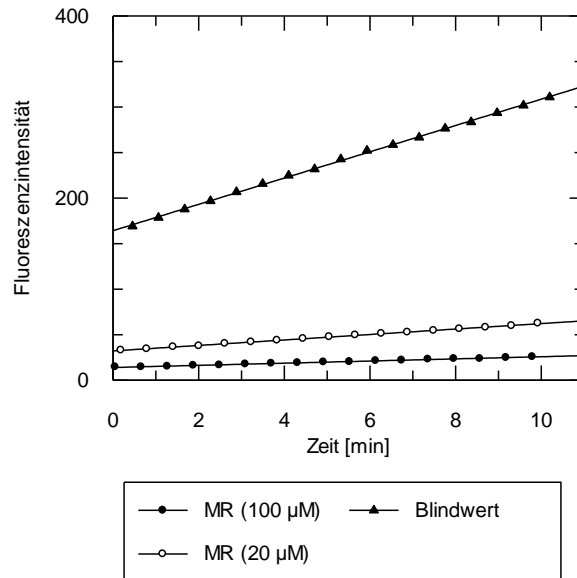


Abbildung 4.5: Umsatz-Zeit-Diagramm: Testung von Methylrot in Konzentrationen von 20 und 100 µM an Cathepsin B

Um nun herauszufinden, in welchem Ausmaß der innere Filtereffekt bei den betreffenden Inhibitorkonzentrationen auftritt, kann folgende Testreihe verwendet werden.

Zunächst wird für die betrachtete Inhibitorkonzentration der Standardassay durchgeführt. Anschließend wird für diese Konzentration ein Korrekturfaktor berechnet. Dafür wird zunächst eine AMC-Konzentration gewählt, die ungefähr im gleichen Intensitätsbereich fluoresziert, in dem die Startpunkte im Standardassay liegen. Diese AMC-Konzentration wird nun im Assaypuffer zum einen unter Zusatz von DMSO, im Falle des Blindwertes als Ersatz für die Inhibitorlösung, und zum anderen unter Zusatz des Inhibitors vermessen. Absorbiert der Inhibitor nicht bei der Detektionswellenlänge, so sind die Fluoreszenzintensitäten von beiden Ansätzen gleich. Im anderen Fall kann durch Division der Fluoreszenzintensität des Ansatzes ohne Inhibitor durch die Fluoreszenzintensität des Ansatzes mit Inhibitor ein Korrekturfaktor berechnet werden:^[100]

$$f_{\text{corr}}(c_{\text{inh}}) = \frac{F(c_{\text{ffd}})}{F(c_{\text{ffd}} + c_{\text{inh}})} \quad (31)$$

Dabei steht in der Gleichung (31) die Bezeichnung f_{corr} für den Korrekturfaktor, $F(c_{\text{ffd}})$ für die Fluoreszenzintensität des freien Fluoreszenzdonors ohne Inhibitorzusatz und $F(c_{\text{ffd}} + c_{\text{inh}})$ für die Fluoreszenzintensität des Ansatzes aus freiem Fluoreszenzdonor und Inhibitorlösung. Dieser Korrekturfaktor dient nun dazu, die aus dem Standardassay für die gewählte Inhibitorkonzentration erhaltene Steigung (=Maß der Hydrolyse) zu korrigieren:

$$v_{\text{corr}}(c_{\text{inh}}) = f_{\text{corr}}(c_{\text{inh}}) \cdot v_{\text{roh}}(c_{\text{inh}}) \quad (32)$$

Dabei steht die Bezeichnung $v_{\text{corr}}(c_{\text{inh}})$ für die korrigierte Steigung des Ansatzes des Inhibitors und $v_{\text{roh}}(c_{\text{inh}})$ für die Steigung des Inhibitoransatzes aus dem Standardassay.

Mit der korrigierten Steigung kann anschließend die Inhibition [%] neu berechnet werden:

$$\% \text{Inh}_{\text{corr}} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v_{\text{corr}}(c_{\text{inh}})}{v_{\text{roh}}(c_{\text{inh}} = 0)} \right) \quad (33)$$

Ebenso wird im Falle einer IC_{50} -Wert Bestimmung für alle verwendeten Inhibitorkonzentrationen verfahren.

Nach diesem Protokoll wurde für das Beispiel Methylrot vorgegangen. Dazu wurde eine AMC-Konzentration von 400 nM gewählt. Die Ergebnisse der Testungen sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Bestimmung des inneren Filtereffektes am Beispiel von Methylrot (MR) im Cathepsin B-Assay

	MR (100 µM)(1)	MR (100 µM)(2)	MR (20 µM)(1)	MR (20 µM)(2)	Blindwert
Fluoreszenzintensität (F)	30,8	36,7	71,3	79,7	334,1
Korrekturfaktor (f_{corr})	10,85	9,11	4,69	4,19	
Steigung (v_{roh}) [dF/min]	1,08	1,29	3,00	3,00	13,32
Prozent Inhibition (%Inh)	91,9	90,3	77,5	77,4	
korrigierte Steigung (v_{corr})	11,67	11,76	14,06	12,59	
korrigierte Prozent Inhibition (%Inh_{corr})	12,4	11,7	0,0	5,5	

Die Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei der Inhibition des Methylrots um ein falsch positives Ergebnis aufgrund eines starken inneren Filtereffektes handelte.

Nach Korrektur lässt sich praktisch keine Inhibition mehr feststellen.

Der innere Filtereffekt ist zudem nur von der InhibitorKonzentration nicht jedoch von der AMC-Konzentration abhängig. Testungen auf der Basis von vier verschiedenen AMC-Konzentrationen (200, 400, 800 und 1200 nM) (Abbildung 4.6) belegen dies.

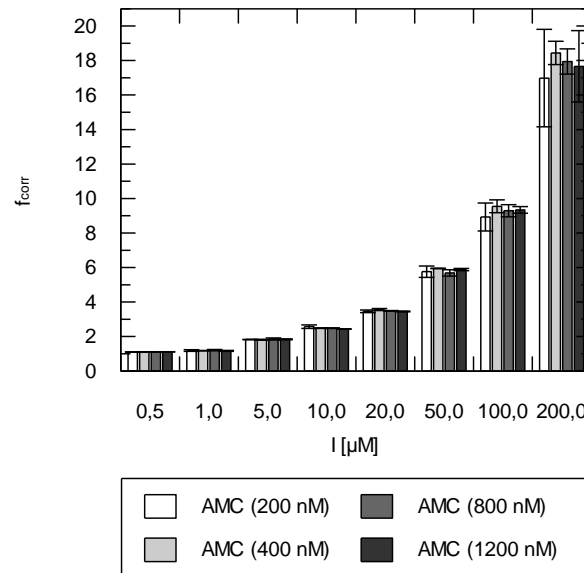


Abbildung 4.6: Testen der Abhängigkeit von f_{corr} zum einen von der InhibitorKonzentration und zum anderen von der AMC-Konzentration

Die Testungen haben gezeigt wie wichtig es ist, den inneren Filtereffekt zu berücksichtigen. Nicht nur FRET-Substrate, sondern vor allem bei der Detektionswellenlänge absorbierende Substanzen müssen um diesen Effekt korrigiert werden, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten.

4.3.2 Testen auf Aggregation

Einige Substanzen zeigen falsch positive Ergebnisse in Folge von Aggregatbildung. Dabei bindet die betrachtete Substanz nicht an das aktive Zentrum des betrachteten Enzyms, sondern bildet Aggregate in einer Größenordnung von 30 bis 1000 nm im Durchmesser aus und lagert sich an das Enzym unspezifisch an.^[101, 102]

Dabei werden unterschiedliche Mechanismen dieser unspezifischen Hemmung von Coan et al. diskutiert.^[104] Zum einen erscheint es möglich, dass das Aggregat das aktive Zentrum blockiert und somit die Bindung des Substrates verhindert. Zum anderen könnte es bei der Interaktion zwischen Enzym und Aggregat zu einer teilweisen Entfaltung des Enzyms kommen oder auch zu einer Einschränkung in der Dynamik und Beweglichkeit des Enzyms bei der Katalyse. Zum jetzigen Zeitpunkt gehen Coan et al. nach ihren Studien davon aus, dass eine teilweise Denaturierung des Enzyms zu der unspezifischen Hemmung führt.

Um eine solche unspezifische Hemmung zu detektieren gibt es verschiedene Methoden. Zum einen können Testungen potenziell aggregatbildender Substanzen an möglichst verschiedenen Enzymen durchgeführt werden. Zeigt eine Substanz starke Inhibition an Enzymen, die in keinerlei Verwandtschaft stehen, so erscheint eine unspezifische Hemmung durch Aggregation sehr wahrscheinlich. Für diese Art des Nachweises sind jedoch eine Vielzahl von etablierten Assays und eine entsprechende Enzymvielfalt erforderlich. Um bei einem einzigen Enzymassay bereits Aussagen über eine mögliche Aggregation zu tätigen, kann mit verschiedenen Methoden vorgegangen werden.

Erste Hinweise auf Aggregation können unter anderem ein steiler Anstieg der sigmoiden Kurve bei der IC_{50} -Wert Bestimmung oder eine nicht-kompetitive Kinetik sein.^[105, 106, 107]

Abbildung 4.7 zeigt solch ein Beispiel für einen sehr steilen Anstieg. Als Maß dient dabei der sogenannte „slope factor“. Das Ausmaß des slope factor (s) lässt sich aus Gleichung (29) berechnen.

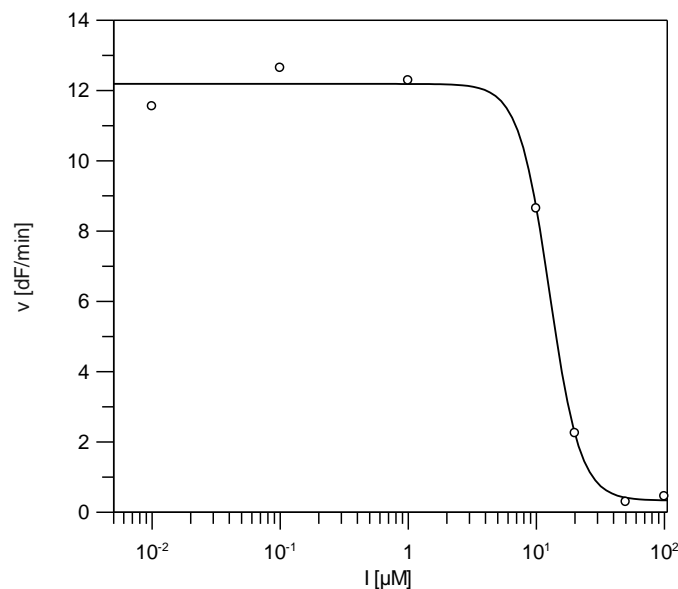


Abbildung 4.7: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von Miconazolnitrat im Chymotrypsin-Assay mit Konzentrationen zwischen 0,01 und 100 μM . Die Enzymkonzentration beträgt dabei 20 nM und die Substratkonzentration 25 μM . Der slope factor beträgt hier 3,62.

Der slope factor ist dabei vergleichbar mit dem Hill-Koeffizienten. Je steiler die Kurve, desto größer der slope factor und desto wahrscheinlicher die Aggregation. Bei Werten von über 1,5 oder 2,0 für diesen Parameter ist eine Aggregation der Testsubstanz sehr wahrscheinlich.^[106, 108]

4.3.2.1 Zusatz von Triton X-100

Eine einfache Methode um Aggregation zu detektieren, ist der Zusatz eines nichtionischen Detergenz, wie z.B. Triton X-100 oder Brij 35, zum betrachteten Assayansatz.^[102, 105, 107, 109, 110]

Durch diesen Zusatz wird die unspezifische Interaktion zwischen dem Aggregat der Testsubstanz und dem Enzym unterbunden. Die Konzentration an Detergenz muss dabei dem jeweiligen Enzym angepasst werden, da höhere Konzentrationen das betrachtete Enzym denaturieren oder auch inhibieren können. Für die meisten Protease-Assays, wie auch bei dem hier verwendeten Cathepsin B- und Chymotrypsin-Assay, ist eine Endkonzentration von 0,01% (v/v) Triton X-100 bzw. Brij 35 empfehlenswert.

In den folgenden Testungen wurde Triton X-100 als Detergenz verwendet. Dabei wurde es dem Assaypuffer so zugesetzt, dass es im Assayansatz eine Endkonzentration von 0,01% (v/v) ergibt. Damit blieb das Pipettierschema im Vergleich zum Standardassay erhalten.

In den Abbildungen 4.8 und 4.9 sind die Ansätze einmal mit und einmal ohne Triton X-100-Zusatz dargestellt:

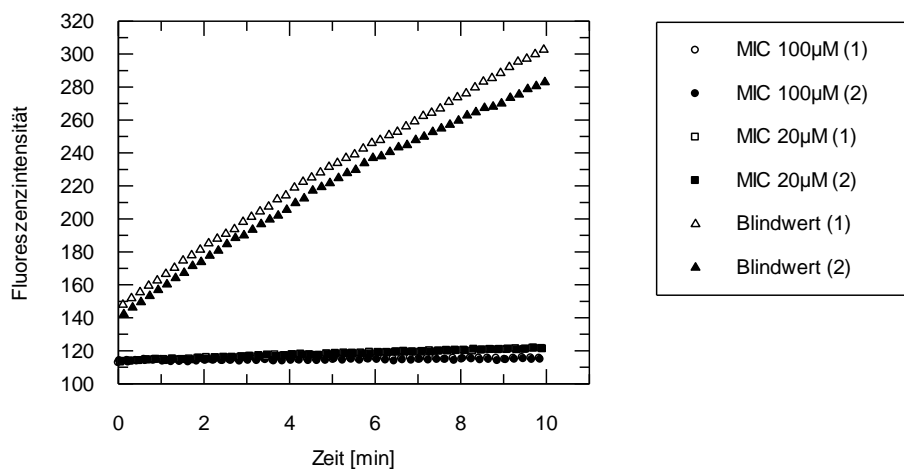


Abbildung 4.8: Messung der Inhibition von Miconazolnitrat ohne Zusatz von Triton X-100

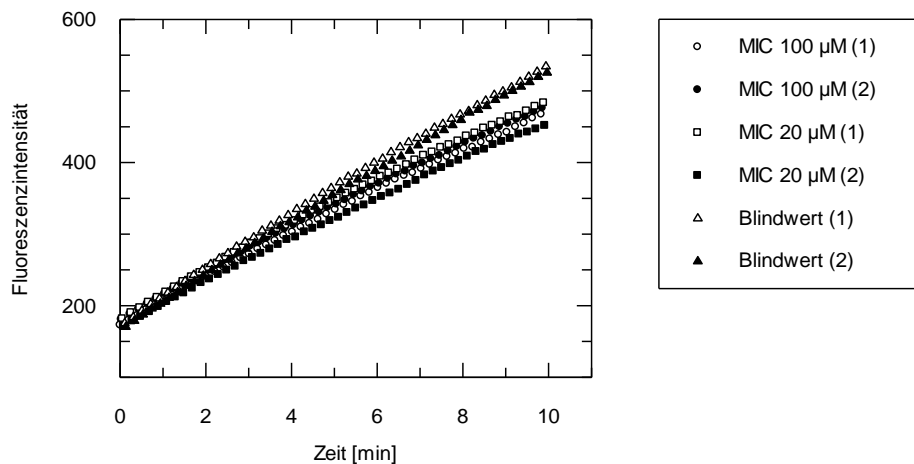


Abbildung 4.9: Messung der Inhibition von Miconazolintriat unter Zusatz von Triton X-100 (0,01%)

Am Beispiel des Miconazolintrats zeigt sich somit die Effektivität des Zusatzes eines nichtionischen Detergenz zur Detektion von Aggregatoren. Nach Zusatz von Triton X-100 nähert sich die Steigung [dF/min] des Ansatzes Chymotrypsin mit Miconazolintriat wieder der des Blindwertes an. Somit ist nun im Gegensatz zum unkorrigierten Assay ohne Detergenzzusatz keine Inhibition mehr zu verzeichnen.

Tabelle 4.2: Vergleich der Inhibitionswerte [%] zum einen ohne und zum anderen mit Zusatz von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,01% ¹⁾

	Miconazolintriat [20 µM]	Miconazolintriat [100 µM]
Inhibition [%] ohne Zusatz von Triton X-100	94,7 ± 0,0	99,1 ± 0,212
Inhibition [%] unter Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	18,2 ± 3,89	17,8 ± 0,07

¹⁾ zur deutlicheren Darstellung: Mittelwert aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung der Einzelwerte (Einzelwerte siehe Anhang)

4.3.2.2 Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA)

Alternativ zu einem nichtionischen Detergenz kann dem Assayansatz bovines Serumalbumin (BSA) zugesetzt werden.^[111]

Dabei ist jedoch bislang wenig darüber bekannt, in welcher Art und Weise die Aggregation durch den Zusatz von BSA vermieden wird.^[111] Eine Erklärung liegt in der Tatsache, dass BSA ebenso wie das humane Serumalbumin unspezifisch variable Klassen von Liganden bindet.^[111, 112]

Zur Prüfung, ob im vorliegenden Chymotrypsin-Assay ebenfalls eine Minderung der Aggregatbildung durch Zusatz von BSA eintritt, wurden wiederum Testungen mit

Miconazolnitrat einmal ohne und einmal mit Zusatz von BSA in einer Konzentration von 0,1% durchgeführt.

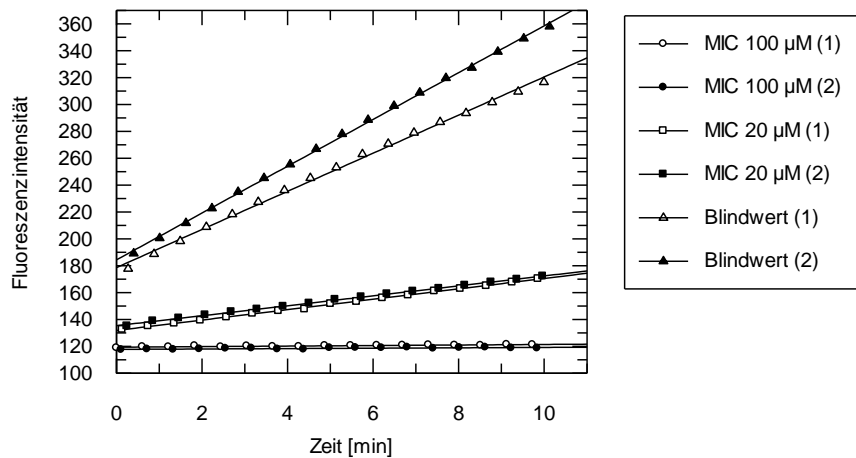


Abbildung 4.10: Testung von Miconazolnitrat in Konzentrationen von 20 und 100 µM ohne Zusatz von BSA im Assaypuffer

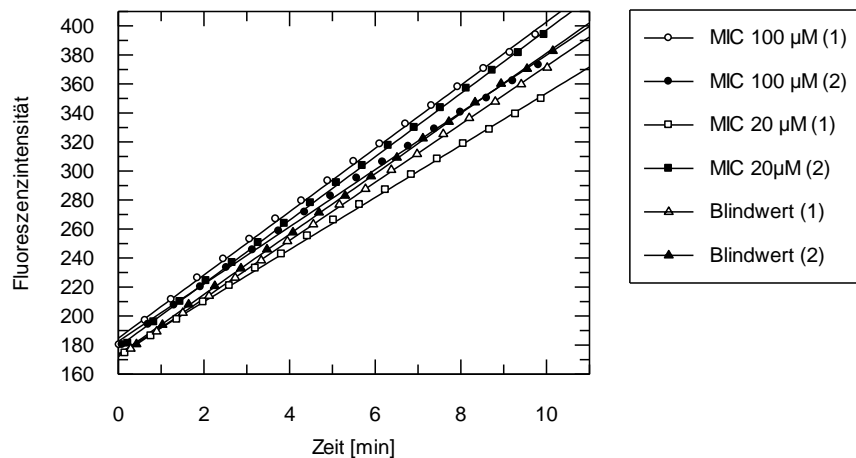


Abbildung 4.11: Testung von Miconazolnitrat in Konzentrationen von 20 und 100 µM unter Zusatz von BSA (0,1%) im Assaypuffer

Die Abbildungen 4.10 und 4.11 zeigen einen deutlichen Effekt des Zusatzes von BSA auf die scheinbare Inhibition. Ebenso wie nach Zusatz von Triton X-100 (0,01%) wird die Steigung für die Inhibitoransätze wieder steiler, was für eine höhere Restaktivität des Enzyms steht.

Tabelle 4.3: Vergleich der Inhibitionswerte [%] zum einen ohne und zum anderen mit Zusatz von BSA in einer Endkonzentration von 0,1% ¹⁾

	Miconazolnitrat [20 µM]	Miconazolnitrat [100 µM]
Inhibition [%] ohne Zusatz von BSA	76,6 ± 0,07	98,9 ± 0,283
Inhibition [%] unter Zusatz von BSA (0,1%)	6,05 ± 8,56	1,75 ± 2,47

¹⁾zur deutlicheren Darstellung: Mittelwert aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung der Einzelwerte (Einzelwerte siehe Anhang)

Die Messungen zeigen, dass alternativ zum nichtionischen Detergenz Triton X-100 auch der Zusatz von BSA für die Detektion von Aggregaten geeignet ist.

In weiteren Testungen wurden zum einen aufgrund der Tatsache, dass sich bei beiden Zusätzen gleiche Ergebnisse zeigten und zum anderen aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit des Zusatzes von Triton X-100 auf die Testungen unter Zusatz von BSA verzichtet.

4.3.2.3 Michaelis-Menten-Kinetik

Wie bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben, weisen aggregatbildende Substanzen eine nicht-kompetitive Kinetik auf.^[107, 113]

Zur Verifizierung dieses Hemmmechanismus wird eine Michaelis-Menten-Kinetik aufgenommen.

Dazu werden Inhibitorkonzentrationen gewählt, deren Inhibition im Bereich zwischen 30 und 75% liegen.^[87]

Bei vier festen Inhibitorkonzentrationen werden die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt. Über die Michaelis-Menten-Gleichung werden dadurch die Parameter K_m und V_{max} berechnet.^[87]

Liegt eine kompetitive Kinetik vor, so variieren die K_m -Werte bei gleichbleibendem V_{max} . Bei einer nicht-kompetitiven Kinetik verhält es sich genau umgekehrt.

In Abbildung 4.12 ist ein Beispiel einer nicht-kompetitiven Kinetik dargestellt:

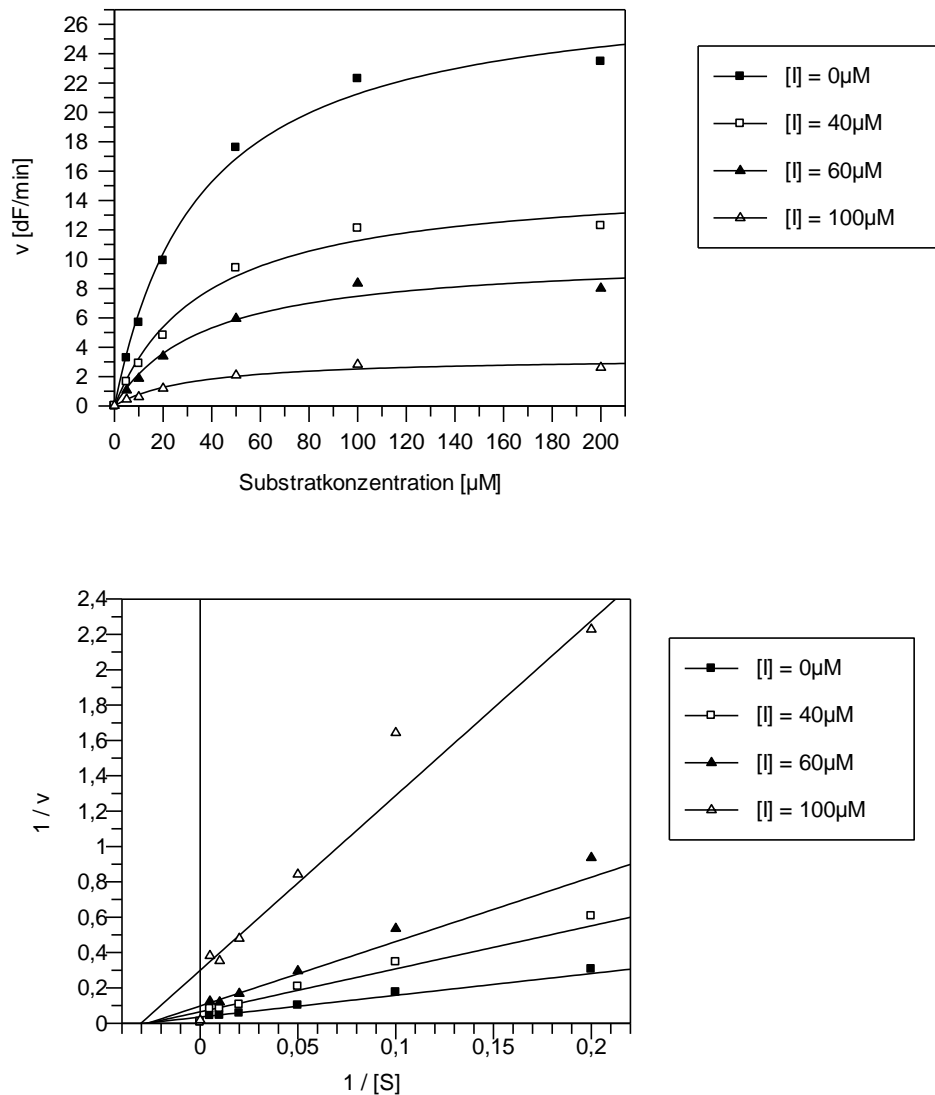


Abbildung 4.12: Beispiel der nicht-kompetitiven Kinetik eines Aggregatbildners. Die obere Abbildung stellt dabei die Michaelis-Menten-Kinetik dar, die untere Abbildung den Lineweaver-Burk-Plot

In Abbildung 4.12 ist deutlich zu erkennen, dass sich in der Lineweaver-Burk-Darstellung^[114] die Geraden alle in einem Punkt auf der x-Achse treffen. Dieser Punkt ist der negative Kehrwert der Michaelis-Menten-Konstante K_m . Demgegenüber zeigen die Geraden stark unterschiedliche y-Achsenabschnitte, welche für den negativen Kehrwert von v_{max} stehen. Durch diese graphische Darstellung wird somit die nicht-kompetitive Kinetik belegt.

Für die Testungen an Chymotrypsin und Cathepsin B wurde diese zusätzliche Beweisführung für Aggregate noch nicht angewendet. Bei den Testungen an der SARS-CoV M^{pro} ist die Michaelis-Menten-Kinetik zu einem wichtigen Bestandteil im Assay-Arbeitsablauf geworden, um Aggregate umfassend zu detektieren (siehe Kapitel 5).

4.3.2.4 Zentrifugieren

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von Aggregaten bietet das Zentrifugieren des Assayansatzes. Dabei wird in einer temperierbaren Mikrozentrifuge der Ansatz aus Enzym und Inhibitor in Pufferlösung für einige Minuten zentrifugiert, sodass sich die Aggregate abtrennen lassen.

In den durchgeführten Versuchen war es jedoch schwierig die Drehzahl (Umdrehungen pro Minute) einzustellen. Entweder wurde die Drehzahl zu niedrig gewählt, sodass sich keinerlei Effekt erzielen ließ oder die Drehzahl war so hoch, dass auch die Enzymaktivität des Blindwertes im starken Ausmaß gemindert wurde.

Daher wurde in Anbetracht dessen, dass bereits einige einfache und wirksame Methoden zur Detektion von Aggregatoren zur Verfügung stehen, diese Methode zur Detektion im bestehenden Assay verworfen.

4.3.2.5 Dynamic Light Scattering

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als Photonenkorrelationsspektrometrie (PCS) bezeichnet, ermöglicht die Bestimmung der Partikelgröße von sehr kleinen Partikeln in einer Größenordnung von 5 nm bis 5 µm. Die Partikelgröße wird dabei indirekt ermittelt. Das von einem Laser erzeugte Licht wird von den Partikeln gestreut. Die Intensität des Streulichts wird anschließend je nach Gerät in einem bestimmten Winkel (meist 90° oder 173°) über einen Photomultiplier detektiert (Abbildung 4.13).^[115]

Dabei werden Schwankungen der Streulichtintensität in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Diese Schwankungen ergeben sich durch die Brown'sche Molekularbewegung der Teilchen. Kollisionen der Partikel mit Lösemittelmolekülen versetzen erstere in Bewegung. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Größe der Partikel sowie von der Viskosität des Lösemittels und der Temperatur, bei der die Messung durchgeführt wird.^[116]

Je nach Größe der Teilchen kommt es zu unterschiedlichen zeitlichen Änderungen in der Streulichtintensität. Kleinere Partikel besitzen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als größere Partikel. Daraus resultiert eine schnellere zeitliche Änderung der Streulichtintensität für kleinere Partikel. Ein Korrelator (siehe Abbildung 4.13) berechnet aus diesen zeitlichen Schwankungen eine Autokorrelationsfunktion (Abbildung 4.14), aus der die Partikelgrößenverteilung bestimmt wird.^[115]

Zur Testung, inwieweit diese Methode für den Arbeitsablauf geeignet ist, sollte zunächst wiederum das bereits als Aggregatbildner bekannte Miconazolnitrat vermessen werden.

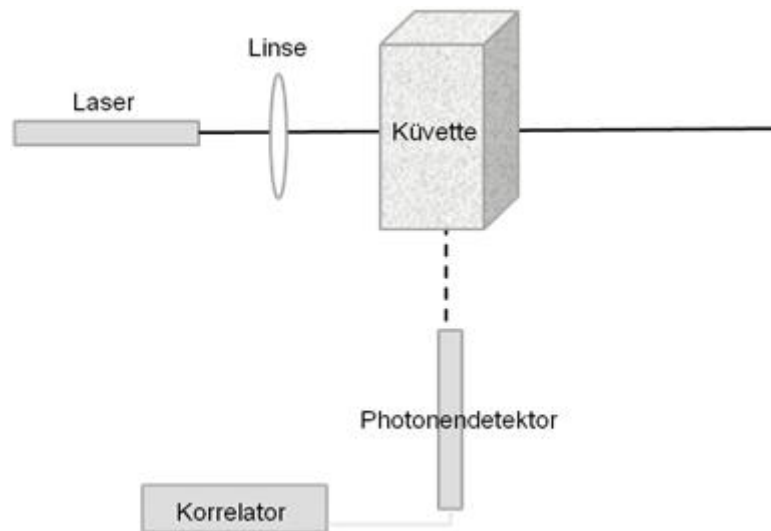


Abbildung 4.13: Aufbau eines DLS-Messgerätes (Messung im 90° Winkel)

Um die Messung durchführen zu können, mussten zunächst einige Parameter des Puffermediums, wie etwa der Brechungsindex und die Viskosität bestimmt werden. Für die Bestimmung des Brechungsindex wurde mit einem temperierbaren (20°C) Refraktometer gemessen. Damit ergaben sich folgende Werte (Tabelle 4.4):

Tabelle 4.4: Bestimmung des Brechungsindex der verwendeten Assaypuffer

Pufferlösung	Brechungsindex, temperiert (20°C)
Tris-Puffer pH 6,0 ¹⁾	1,3542
Tris-Puffer pH 7,5 ²⁾	1,3546
Tris-Puffer pH 8,0 ³⁾	1,3498

¹⁾ verwendet für den Cathepsin B-Assay, ²⁾ für den SARS-CoV M^{pro}-Assay, ³⁾ für den Chymotrypsin-Assay

Die Bestimmung der Viskosität erfolgte mit einem Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde. Dazu wurde zunächst die Dichte der jeweiligen Pufferlösungen gemessen, um anschließend die bestimmte kinematische Viskosität in die Dynamische umzurechnen (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Bestimmung der Viskosität der verwendeten Assaypuffer

Pufferlösung	Dichte	kinematische Viskosität [min/s]	dynamische Viskosität
Tris-Puffer pH 6,0¹⁾	1,0028	1,271	1,275
Tris-Puffer pH 7,5²⁾	1,0221	1,266	1,294
Tris-Puffer pH 8,0³⁾	1,0165	1,192	1,212

¹⁾ verwendet für den Cathepsin B-Assay, ²⁾ für den SARS-CoV M^{pro}-Assay, ³⁾ für den Chymotrypsin-Assay

Die Bestimmung dieser Parameter ist bedeutsam, da die Eigenschaften des Mediums die Beweglichkeit der Teilchen beeinflussen und so wichtige Parameter bei der späteren Korrelationsfunktion darstellen.

Die Bestimmung der Aggregatgröße soll nun exemplarisch am Chymotrypsin-Assay mit einer Miconazolnitratkonzentration von 20 µM verdeutlicht werden. Zunächst wird die betreffende Pufferlösung mit Hilfe eines PVDF-Filters mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert, um zu vermeiden, dass eventuelle Partikel in der Pufferlösung die Messung verfälschen.

Diese gefilterte Pufferlösung wird nun in einer Halbmikroküvette im DLS-Gerät vermessen und auf eine mögliche Korrelation und damit eine mögliche Partikelgrößenverteilung untersucht.

Anschließend wird einem Ansatz von gefiltertem Puffermedium die Inhibitorlösung zugeführt und die Größenverteilung dieser Lösung bestimmt. Wie zu erwarten, zeigte ein Ansatz mit Miconazolnitrat eine mittlere Größe von 111 nm.

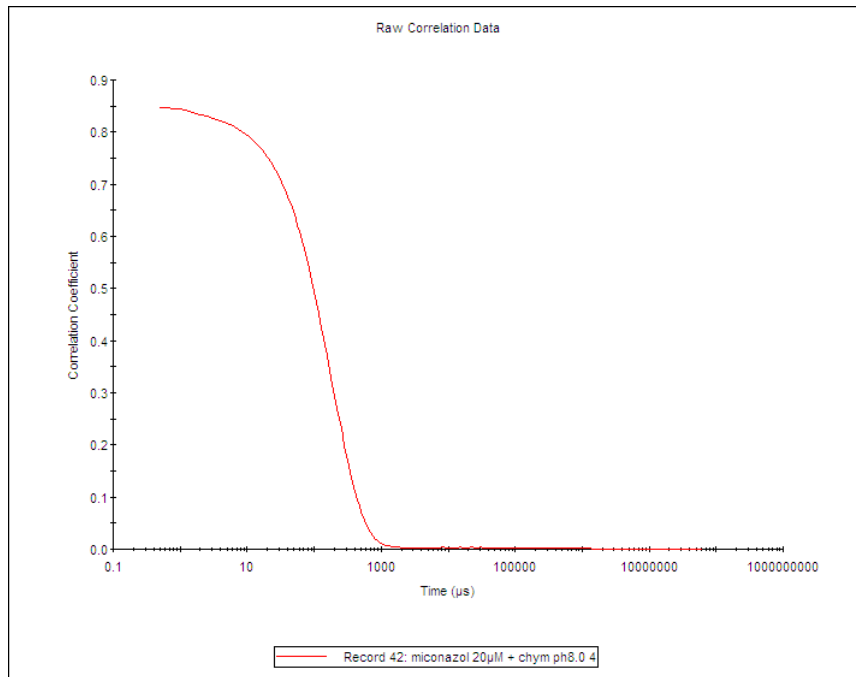


Abbildung 4.14: Korrelationsfunktion der DLS-Messung, die der Berechnung der Größenverteilung dient

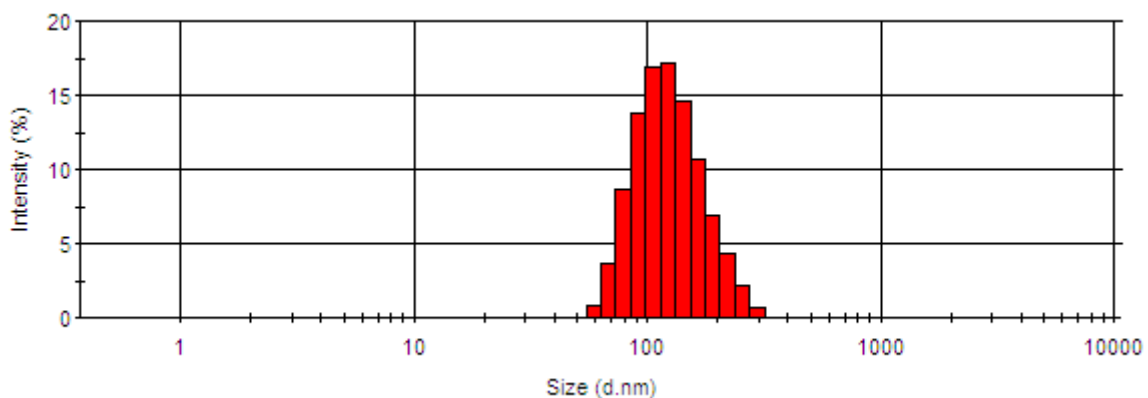


Abbildung 4.15: Aggregatgrößenverteilung für eine Lösung, die 20 µM Miconazolnitrat und 20 nM Chymotrypsin in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 enthält. Die Messung erfolgte direkt nach Herstellung der Lösung. Die mittlere Größe liegt hier bei 111 nm.

4.3.2.6 Transmissionselektronenmikroskop

Eine Möglichkeit, die vorliegenden Aggregate zu visualisieren, bietet das Transmissionselektronenmikroskop.^[105]

Am Beispiel des Miconazolnitrats soll das Vorgehen erläutert werden. Zunächst wird eine Inhibitorlösung in der für den Assay verwendeten Konzentration (für den verwendeten Chymotrypsin-Assay: 20 µM) in gefiltertem Puffer (50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 für die Testung an Chymotrypsin) hergestellt. Anschließend wird ein Karbongitter mit 10 µl dieser Lösung für 30 s getränkt. Ein Überschuss der Lösung wird mit Hilfe von Filterpapier entfernt.

Das Gitter wird nun dreimal mit dem verwendeten Puffer gewaschen und anschließend für eine negative Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure (2% wässrige Lösung pH 5,2) für 20 s versetzt.

Das Gitter wird nun im Transmissionselektronenmikroskop auf mögliche Aggregate untersucht. Das Resultat für Miconazolnitrat ist in Abbildung 4.16 zu sehen. Hier lässt sich deutlich erkennen, dass sich Aggregate ausbilden, die in einer Größenordnung zwischen 100 und 200 nm liegen. Damit konnten die Ergebnisse der DLS-Messung bestätigt werden.

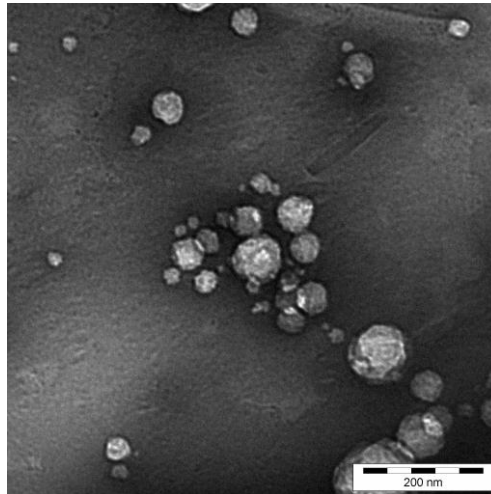


Abbildung 4.16: Elektronenmikroskopieabbildung von Miconazolnitrat in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8.0 ohne Triton X-100-Zusatz. Die Aggregate sind dabei deutlich zu erkennen.

4.4 Kovalente und nichtkovalente Bindungen

Häufig liegt das Ziel der Arzneimittelforschung in der Entwicklung von reversiblen, kompetitiven Inhibitoren. Andererseits können spezifische kovalente Inhibitoren das betreffende Target dauerhaft inaktivieren. Für beide Wege ist es von Bedeutung in der Assaydurchführung den vorliegenden Bindungsmechanismus herauszufinden.

Eine einfache Methode, um erste Hinweise auf die Bindungsart zu bekommen, ist ein erhöhter Zusatz von DTT zum Assaymedium. DTT wird bei der Durchführung von Cysteinprotease-Assays häufig den Enzymlösungen als Reduktionsmittel zugesetzt, um zu vermeiden, dass das Cystein im aktiven Zentrum Disulfidbrücken eingeht. So wird die Aktivität der Cysteinprotease gewahrt.

Bei den Testungen auf kovalente Bindungen wird das DTT jedoch nicht als Reduktionsmittel, sondern vielmehr als alternativer Thiol donor verwendet. Dabei wird dem Assaypuffer zusätzlich DTT hinzugefügt, so dass im Falle des Chymotrypsin- und SARS-Assays eine Endkonzentration von 700 μ M und im Falle des Cathepsin B-Assays eine finale DTT-

Konzentration von $845\ \mu\text{M}$ entsteht. Liegt ein unspezifischer elektrophiler Inhibitor vor, so kann dieser nun anstatt an die nucleophilen Aminosäuren der betrachteten Proteasen (Cystein, Serin) an die nucleophilen Thiolgruppen des DTTs binden. Vergleicht man nun den Assayansatz ohne zusätzlichen DTT-Zusatz mit dem Assayansatz mit erhöhtem DTT-Anteil, so lässt sich relativ leicht ein kovalenter Inhibitor identifizieren. Durch erhöhten Zusatz von DTT sinkt die Inhibition der Substanz im Hinblick auf das betrachtete Enzym. Dieser Effekt lässt sich nur mit den erhöhten Konzentrationen an DTT im Assaypuffer feststellen. Der Anteil, der für die Reduktion des Enzyms hinzugefügt wird, reicht in seiner Endkonzentration im Assayansatz nicht aus, um eine kovalente Bindung zu verifizieren.

Im Folgenden ist dieser Effekt exemplarisch mit einem Thiobarbital (T1) (Formel siehe Seite 59) für den Chymotrypsin- und Cathepsin B-Assay durchgeführt worden (Abbildung 4.17).

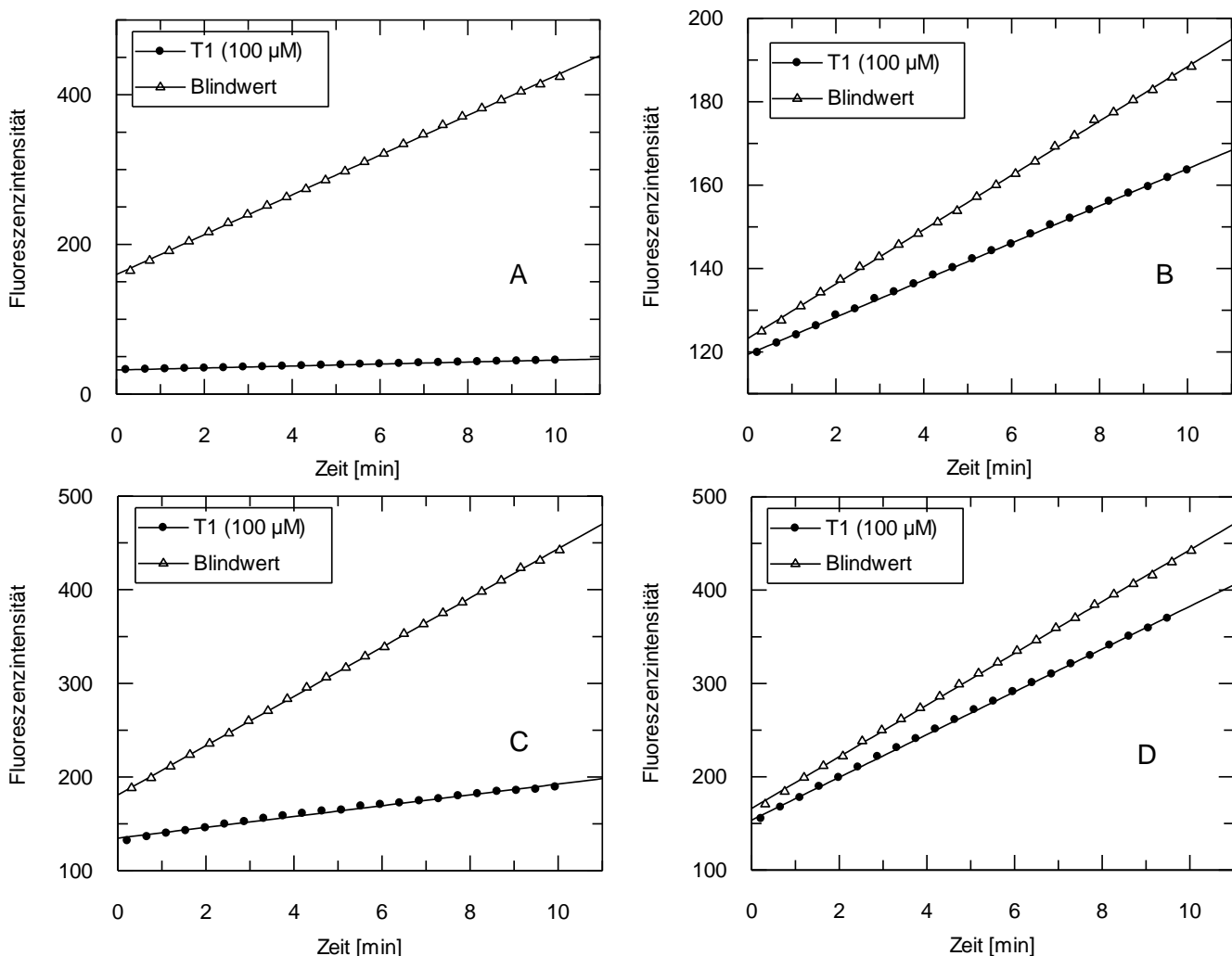


Abbildung 4.17: Bestimmung der Restaktivität der Serinprotease Chymotrypsin (A und B) sowie der Cysteinprotease Cathepsin B (C und D). A: Restaktivität von Chymotrypsin ohne Zusatz von DTT, B: Restaktivität von Chymotrypsin unter Zusatz von $700\ \mu\text{M}$ DTT, C: Restaktivität von Cathepsin B mit niedrigem DTT-Zusatz ($145\ \mu\text{M}$), D: Restaktivität von Cathepsin B mit erhöhtem DTT-Zusatz ($845\ \mu\text{M}$)

Als Inhibitor diente exemplarisch ein Thiobarbital (T1).

Man erkennt deutlich, dass in beiden Assays die Enzymaktivität der Assayansätze mit zugesetztem Inhibitor (hier:T1) durch einen erhöhten Zusatz von DTT größer ist, als im Ansatz mit niedrigem oder fehlendem DTT-Zusatz. Dies deutet auf eine unspezifische Reaktion der zugesetzten Testsubstanz mit Thiolen hin.

4.5 Reversible und irreversible Kinetik

Die Kenntnis, ob eine kovalente Bindung oder nichtkovalente Interaktion vorliegt, ist jedoch noch nicht ausreichend. Zusätzlich ist es von Bedeutung zu wissen, ob die Inhibition in einer reversiblen oder irreversiblen Kinetik erfolgt. Die Kinetik nimmt zusätzlich auch Einfluss auf die zur Charakterisierung der Inhibition hinzugezogenen Parameter.

Im Falle einer reversiblen Kinetik stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der „freien“ Form des Enzyms (E bzw. ES) und dem Komplex mit dem Inhibitor (EI bzw. ESI) (siehe Kapitel 3.2.1) ein. Der Inhibitor kann vom Enzym abdissoziieren. Liegt eine irreversible Kinetik vor, so ist diese Dissoziation nicht möglich, da das Enzym durch den gebundenen Inhibitor inaktiviert wird.^[78]

Um zu überprüfen, zu welchem Anteil der freie Ligand vorliegt, gibt es verschiedene Techniken, die dieses unterschiedliche Verhalten hinsichtlich der Dissoziation nutzen. Zum einen lässt sich der Anteil an freiem Liganden über Messtechniken wie Ultrafiltration, Gelfiltration sowie Gleichgewichtsdialyse^[90] feststellen. Im Falle der Ultrafiltration wird unter Druck eine Lösung, die Enzym und Inhibitor enthält, durch eine Membran filtriert. Dabei ist die Membran nur durchlässig für den niedermolekularen Inhibitor. Auch in der Gelfiltration kann der deutlich größere Enzym-Inhibitor-Komplex vom freien Liganden getrennt werden. In der Gleichgewichtsdialyse wird ebenso wie bei der Ultrafiltration die Passage durch eine semipermeable Membran ausgenutzt.

Zur Bestimmung der Art der Kinetik, reversibel oder irreversibel, ist besonders eine speziellere Form der Dialyse geeignet. Hier betrachtet man anstelle des Anteils an freiem Liganden, die verbliebene „freie“ Form des Enzyms, die nicht die semipermeable Membran passieren kann.

Über die Messung der Enzymaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten kann die Art der Kinetik bestimmt werden. Regeneriert sich das Enzym in Abhängigkeit von der Zeit zeigt dies auf, dass sich der Inhibitor abdissoziieren lässt und somit eine reversible Kinetik aufweist. Im Falle einer irreversiblen Kinetik bleibt das Enzym inaktiv.

Im Folgenden soll die Messtechnik der Dialyse zur Bestimmung der Restaktivität des betrachteten Enzyms näher erläutert werden.

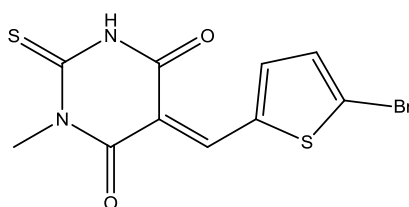
4.5.1 Dialyse

Das Prinzip der Dialyse beruht auf einem einfachen Vorgang:

Zwischen einer inneren und einer äußeren Dialysekammer befindet sich eine semipermeable Membran, die nur von kleinen Molekülen passiert werden kann. Um zu prüfen, ob ein Inhibitor wieder vom Enzym abdissoziiert oder fest gebunden bleibt, werden Ansätze, die den betreffenden Puffer, das Enzym und den Inhibitor aufweisen in die innere Dialysekammer eingebracht. Die äußere Dialysekammer ist komplett mit dem verwendeten Puffer gefüllt, der einen dem Assayansatz vergleichbarem DMSO-Gehalt enthält. Handelt es sich bei dem betrachteten Inhibitor um eine Substanz, die nicht irreversibel bindet und klein genug ist, die semipermeable Membran zu passieren, stellt sich zwischen der inneren und der äußeren Membran ein Gleichgewicht ein. Durch Anschluss einer peristaltischen Pumpe an die äußere Dialysekammer wird die Pufferlösung ständig erneuert und der Anteil des Inhibitors, der die Membran passiert hat, aus dem System entfernt. Nach diesem Prinzip lässt sich zwischen der inneren und der äußeren Dialysekammer prinzipiell kein Gleichgewicht einstellen und der Inhibitor kann aufgrund des vorliegenden Gradienten fortlaufend vom Enzym abdissoziieren und durch die Membran in die äußere Dialysekammer diffundieren. Werden nun in zeitlichen Abständen aus der inneren Dialysekammer Proben gezogen, mit Substrat versetzt und fluorimetrisch vermessen, so lässt sich feststellen, dass das Enzym in der inneren Dialysekammer wieder an Aktivität gewinnt. Bindet ein Inhibitor irreversibel, so lässt sich dieser Effekt nicht feststellen. Alternativ zu der vorliegenden Methode, nach der die Enzymaktivität in der inneren Dialysekammer bestimmt wird, ließe sich auch der Anteil des freien Inhibitors in der äußeren Dialysekammer messen. Für die vorliegenden Enzymassays ist hier jedoch die erstere Variante zu bevorzugen.

Für die Versuche wurde eine spezielle Dialysekammer in Anlehnung an den verwendeten Aufbau des Arbeitskreis Schirmeisters der Universität Würzburg angefertigt (siehe experimenteller Teil).

Zur Erprobung des Prinzips wurde ein potenziell irreversibler Inhibitor, ein Thiobarbital (T1), an Chymotrypsin getestet.



Thiobarbital (T1)

Für die Testung wurde zunächst ein Dialyseschlauch, Visking 27/32 (Carl Roth), angefeuchtet, aufgeschnitten und als Membranschicht zwischen die fünf inneren und die äußere mit Pufferlösung gefüllte Dialysekammer gespannt. Die an die äußere Dialysekammer angeschlossene peristaltische Pumpe fördert nun ständig neue Pufferlösung durch die äußere Dialysekammer mit einer eingestellten Flussrate von 10-15 ml/min. Das System wird zunächst einige Zeit laufen gelassen. Dabei ist genauestens darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen unter der Membran befinden, die einen etwaigen Austausch an der Membran behindern könnten.

Läuft das System stabil, so können anschließend die fünf inneren Dialysekammern mit Proben befüllt werden. Dabei werden vier der fünf Kammern für Messungen mit Inhibitoransätzen genutzt und eine Kammer für den Blindwert.

Im Falle der Testung nach dem Chymotrypsin-Assay wird die äußere Dialysekammer mit 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 unter Zusatz von 10% DMSO befüllt. Da die Assayansätze ebenfalls einen Anteil von 10% DMSO aufweisen, ist somit das Assaymedium sowohl in den inneren wie auch in der äußeren Dialysekammer gleichwertig.

Die inneren Dialysekammern können nun mit den Assayansätzen versehen werden. Dazu werden die Ansätze entsprechend der Anzahl der geplanten Probennahmen vervielfacht.

Im Beispiel des Thiobarbitals wurde der vierfache Ansatz, also 880 µl Tris-Puffer, 20 µl Enzymlösung und 80 µl Inhibitorlösung (zweimal in einer Endkonzentration von 100 µM und zweimal in einer Endkonzentration von 20 µM) vorbereitet. Aus den jeweiligen Ansätzen wurden nun Proben (245 µl) für die erste Messung zum Zeitpunkt $t = 0$ min gezogen, mit 5 µl der Substratlösung (25 µM Endkonzentration) versehen und anschließend sofort fluorimetrisch vermessen. Das restliche Volumen der Proben wurde nun entsprechend in die fünf inneren Dialysekammern pipettiert. Zu gewählten Zeiträumen (hier: nach 120 und 240 min) wurden wiederum Proben (245 µl) aus den inneren Kammern gezogen und mit Substrat vermessen. Die Zeiträume der Dialyse orientierten sich dabei unter anderem an der Stabilität des Enzyms. In Tabelle 4.6 sowie in Abbildung 4.18 lässt sich deutlich erkennen, dass sich das Chymotrypsin nach den gewählten Zeiträumen nicht wieder regeneriert. Es handelt sich hier also um eine irreversible Inhibition.

Des Weiteren lässt sich aus Abbildung 4.18 schließen, dass die Steigung des Blindwertes im Laufe der Messungen abnimmt. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass das Enzym über den Zeitraum unter den gegebenen Bedingungen ein wenig an Aktivität verliert. In Relation bleibt die Inhibition des Thiobarbitals aber erhalten.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Dialyse des Thiobarbitals T1

Inhibitorkonzentration [μM]	100		20	
%Inhibition, $t = 0 \text{ min}$	96,5	97,0	97,1	97,1
%Inhibition, $t = 120 \text{ min}$	99,7	99,4	94,5	93,3
%Inhibition, $t = 240 \text{ min}$	99,4	99,6	92,6	90,8

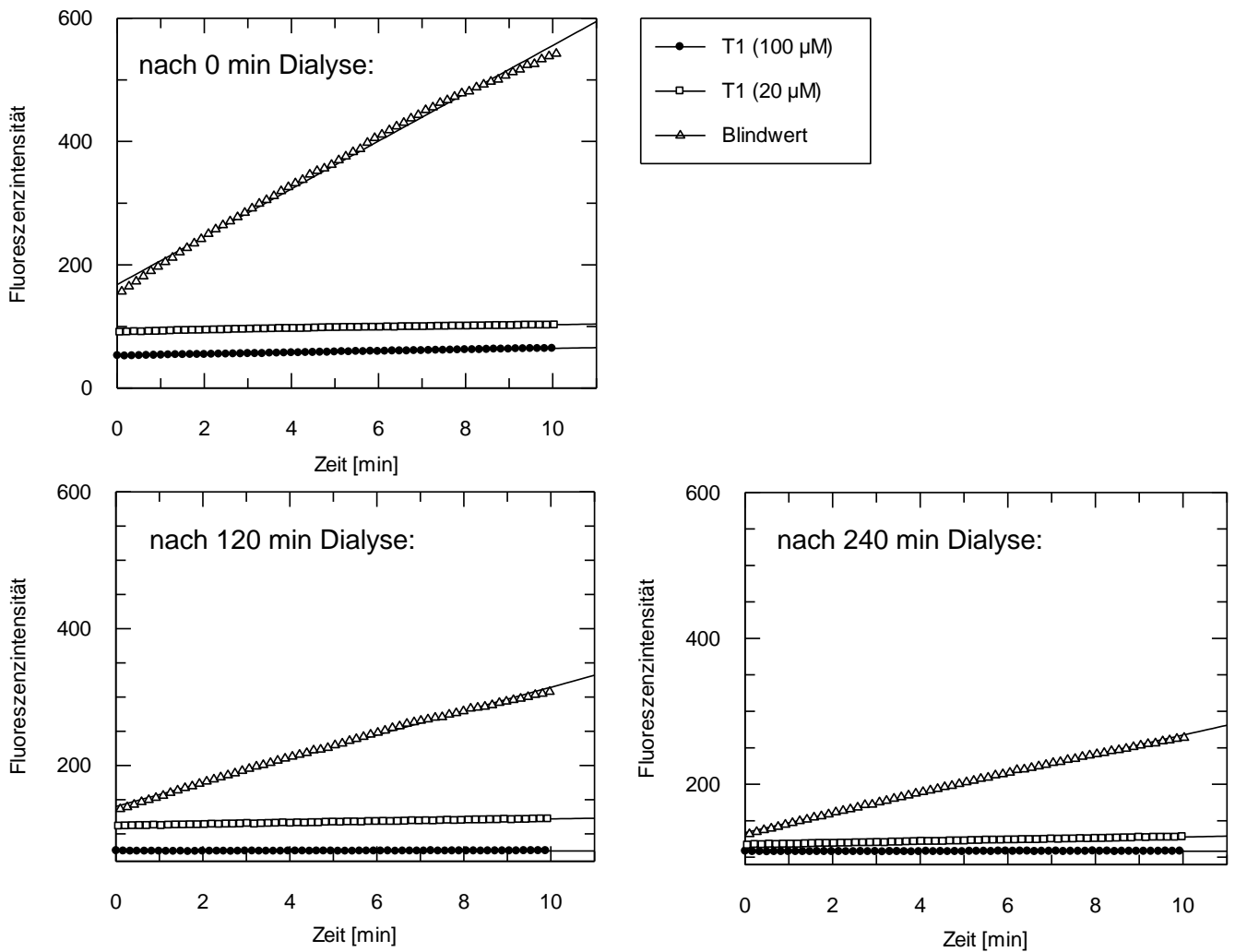
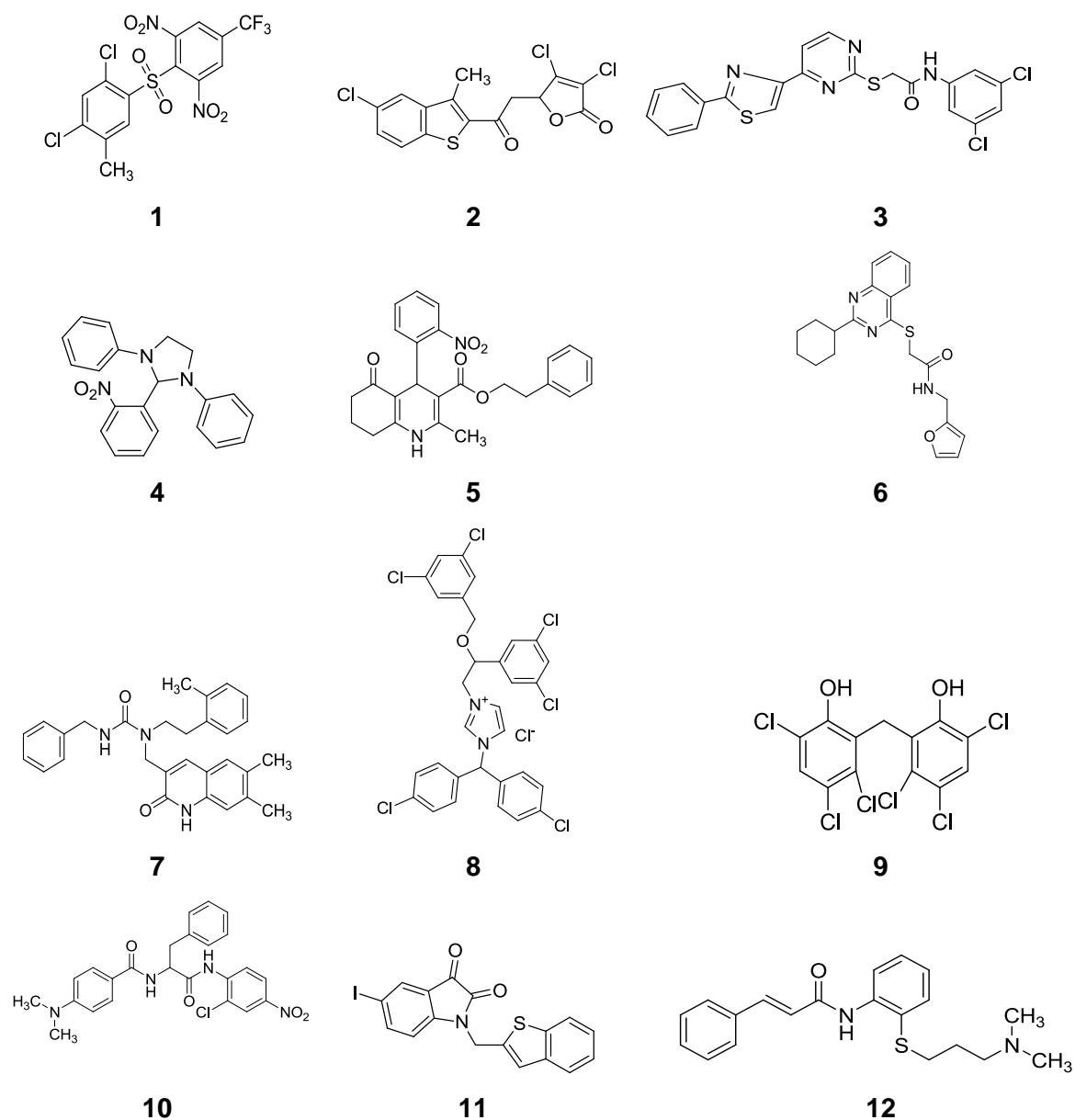


Abbildung 4.18: Dialyse des Thiobarbitals T1. Messung der Restaktivität des Enzyms nach 0, 120 und 240 min

5 Anwendung des erarbeiteten Arbeitsablaufs auf die SARS-CoV Hauptprotease

5.1 Auswahl potenzieller Inhibitoren für die Hitvalidierung

Bei der Auswahl wurden bereits in der Literatur beschriebene potente, nichtpeptidische Inhibitoren gewählt:



Substanz **1** wird in einer Publikation von Lu et al.^[117] als nichtkovalenter Inhibitor beschrieben, der mit einem IC_{50} -Wert von 0,3 μM eine hohe Hemmwirkung an der SARS-CoV M^{pro} aufweist. Des Weiteren wird von den Autoren eine Kristallstruktur angegeben, die die Lage dieses Inhibitors in der Bindetasche aufzeigt (pdb: 2gz7). Aus verschiedenen Gründen erschien Substanz **1** interessant für die geplante Hitvalidierung. Zum einen sollte der Hemmmechanismus von Substanz **1** verifiziert werden, da Lu et al. experimentelle

Belege für eine nicht-kovalente Interaktion angeben. Zum anderen erschien es als interessanter Aspekt, dass diese Substanz in einer weiteren Publikation von Blanchard et al.^[118] beschrieben wird. In dieser Veröffentlichung wurde nach dem primären HTS ein sekundäres Screening angeschlossen, um die Hemmwirkung unter anderem auch auf unspezifische Effekte zu prüfen. Nach diesen Schritten fiel Substanz **1** aus der Hitliste heraus. Aus welchem Grund diese Substanz nach dem sekundären Screening herausfiel, wird von den Autoren jedoch nicht explizit angegeben. Daher erschien es umso interessanter, welchen Wert diese Substanz als Leitstruktur nach der Hitvalidierung des hier erarbeiteten Arbeitsablaufs noch aufweist.

Substanz **2** entstammt der bereits angesprochenen Publikation von Blanchard et al. Im Gegensatz zu Substanz **1** verblieb diese Substanz auch noch nach dem sekundären Screening als vielversprechender Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von $7 \pm 3 \mu M$. Zudem schien eine gewisse Selektivität gegeben zu sein, da an Chymotrypsin und auch an Papain wenig bis keine Hemmwirkung festzustellen war.^[118]

Über Strukturbasiertes Virtuelles Screening sowie QSAR Studien erkannten Tsai et al.^[119] in der Klasse der *N*-Phenyl-2-(2-pyrimidinylthio)acetamide eine neue Leitstruktur für Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} . Von den 28 Substanzen, die von den Autoren beschrieben werden, wurde der Hit mit dem kleinsten IC_{50} -Wert ($3 \mu M$) für die Hitvalidierung ausgewählt (Substanz **3**).

Die Substanzen **4** und **5** werden von Kao et al.^[120, 121] als potente Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} beschrieben. Diese beiden Inhibitoren wurden von den Autoren wie folgt gefunden. Über ein primäres Screening bei einer Konzentration von $20 \mu g/ml$ wurden über 50.000 Substanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaft überprüft, Vero Zellen vor einer SARS Infektion zu schützen. Die Hits aus diesem Screening wurden bei einer Inhibitorkonzentration von $10 \mu g/ml$ einem sekundären Screening unterzogen. Die daraus resultierenden 104 Hits wurden von den Autoren in einem kontinuierlichen fluoreszenzbasierten Assay an der SARS-CoV M^{pro} getestet.^[121] Dabei geben Kao et al. an, dass hierbei zehn Substanzen gefunden wurden, die eine Inhibition über 50 % aufwiesen. Allerdings vermuteten die Autoren unter diesen Substanzen falsch positive Hits durch Lichtstreuung oder auch Absorption. Daher wurden diese zehn Inhibitoren nochmals einem HPLC-Assay unterzogen, der laut Kao et al. nicht für Artefakte anfällig sei. Dabei zeigten lediglich zwei Substanzen bei einer Konzentration von $20 \mu g/ml$ Inhibitionen über 50 %.^[120] Es handelte sich um Substanz **4** (MP521) mit einem K_i von $11 \mu M$ und Substanz **5** (MP576) mit einem IC_{50} -Wert von $2,5 \mu M$ sowie einem K_i von $2,9 \mu M$.

Diese beiden Substanzen sollten demnach, da sie bereits von den Autoren als nicht falsch positive Hits beschrieben wurden, im Rahmen der Hitvalidierung auf ihre Fähigkeit als Leitstruktur geprüft werden.

Mukherjee et al.^[122] geben Substanz **6** und **7** als geeignete Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} an. Dabei verfolgten die Autoren das folgende Protokoll. Über ein virtuelles Screening der Asinex Platinum Datenbank wurden aus ca. 120.000 gelisteten Strukturen 108 für die *in vitro* Testungen gewählt. Dazu wurden zunächst alle 108 Substanzen bei einer festen Konzentration von 10 µM getestet. Für die Substanzen, die dabei eine deutliche Inhibition aufwiesen, wurden anschließend IC₅₀-Werte bestimmt. So zeigte Substanz **6** (PJ07) zunächst bei einer Konzentration von 10 µM 30% Inhibition und Substanz **7** (PJ169) 40% Inhibition. Beide Substanzen zeigten zudem einen IC₅₀-Wert um die 18 µM. Die Autoren machen jedoch keine Angaben dazu, inwieweit auf unspezifische Hemmungen oder Selektivität geprüft wurde. Dies sollte nun im Rahmen der Hitvalidierung durchgeführt werden.

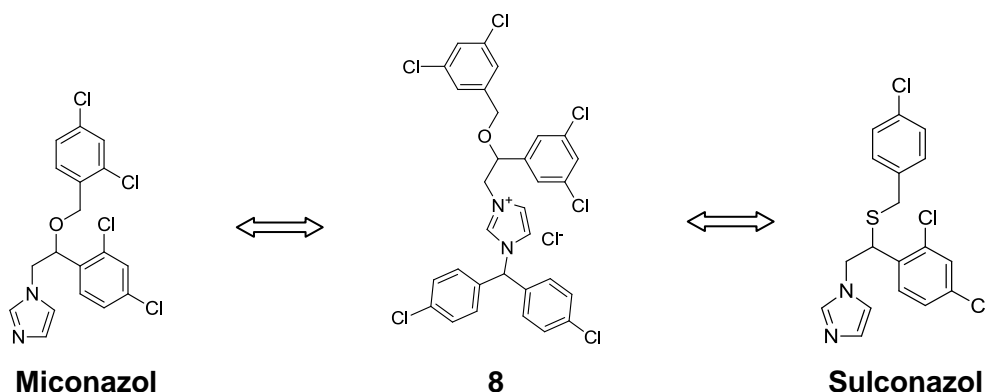
Aufbauend auf die beiden Substanzen haben die Autoren ein ligandenbasiertes Screening gefolgt von einem strukturbasierten Screening durchgeführt, um weitere Inhibitoren zu finden. Die Ergebnisse präsentieren sie in einem kürzlich veröffentlichten Artikel.^[123] Doch auch in dieser Veröffentlichung werden keine weiteren Angaben dazu gemacht, ob die beiden bereits gefunden Hits hinsichtlich ihrer Spezifität weiter untersucht wurden und damit eine valide Basis für ein Screening darstellen. Stattdessen wurden Substanz **6** und **7** als Ausgang für eine Ähnlichkeitssuche in der Asinex Platinum Datenbank verwendet. 44 Substanzen wurden für die Messungen gewählt und zunächst einheitlich bei einer Konzentration von 10 µM getestet. Substanzen, die eine Inhibition von mehr als 25% bei dieser Konzentration aufwiesen, wurden weiter untersucht. Vier Substanzen (PJ207, PJ224, PJ225 sowie PJ316) zeigten dabei gute IC₅₀-Werte im Bereich von 5,8 µM bis 39,4 µM.^[123]

Substanz **8**, das Calmidazoliumchlorid, wurde der Publikation von Liu et al.^[124] entnommen. Die Autoren führten ein virtuelles Screening mittels eines „flexiblen“ dreidimensionalen Modells^[124] der SARS-CoV M^{pro} durch, über das nichtkovalente Inhibitoren gefunden werden sollten. Vierzig Substanzen wurden von Liu et al. anschließend mit Hilfe von HPLC- und kolorimetrischen Assays getestet. Das Calmidazoliumchlorid wies dabei die beste Inhibition mit einem K_i von 61 ± 6 µM auf.

Calmidazolium ist bereits bekannt als Calmodulininhibitor.^[125, 126]

Aufgrund der Aussage der Autoren, dass es sich hier um einen nichtkovalenten Inhibitor handelt, erschien die Substanz geeignet für die Hitvalidierung. Ein weiterer Aspekt war bei der Auswahl noch weit interessanter. Das Calmidazolium weist strukturell eine hohe

Ähnlichkeit zu den bereits als starke Aggregatoren bekannten Substanzen ^[102] Miconazol und Sulconazol auf.



Daher sollte das Calmidazolium gezielt auf diese Art der unspezifischen Hemmung überprüft werden.

Substanz **9**, das Hexachlorophen, wird von Liu et al. ^[127] als kompetitiver Inhibitor der SARS-CoV M^{pro} geführt, der eine zeitabhängige Kinetik aufweist. Mit einem IC₅₀-Wert von 5 µM und einem K_i von 4 µM weist das Hexachlorophen sehr niedrige Hemmkonstanten auf. Die Angabe der zeitabhängigen, reversiblen Kinetik sollte mittels des hier entwickelten Arbeitsablaufs geprüft werden.

Das Anilid, Substanz **10**, wurde von Shie et al. ^[81] in Anlehnung an die Struktur kolorimetrischer Substrate entwickelt. Statt der Hydrolyse dieser Art von para-Nitroanilid (pNA)-Substraten konnte bei einigen abgeleiteten Strukturen eine leichte Inhibition festgestellt werden. Dieser Effekt wurde bereits in zellbasierten Assays bei der Testung von Niclosamid festgestellt. ^[128] Aufbauend auf diesen Beobachtungen, entwickelten Shie et al. weitere peptidische Nitroanilide als Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro}. Dabei zeigte sich Substanz **10** als potenter, kompetitiver Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 0,06 µM und einem K_i von 0,03 µM. Weiterhin geben die Autoren für die Testung an Trypsin, Chymotrypsin und Papain IC₅₀-Werte von mehr als 100 µM an. Damit scheint eine gewisse Selektivität gegeben zu sein.

Substanz **11** gehört zur Klasse der Isatine (2,3-Dioxindole). Die Isatin-Teilstruktur lässt sich in vielen Inhibitoren wiederfinden, die an den unterschiedlichsten Targets diskutiert werden. ^[129] In Screenings der Agouron-Gruppe ^[80] und von Eli Lilly ^[130] wurden Isatine als

Inhibitoren der HRV-3C Protease identifiziert. Webber et al. beschreiben die Isatine dabei als sehr reaktive und reversible Inhibitoren mit K_i -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich.^[80] In antiviralen Testungen wiesen ausgewählte Isatine nach Webber et al. jedoch keine Aktivität unterhalb ihrer toxischen Konzentration auf. Mittels Röntgenstrukturanalyse am Beispiel des stärksten Inhibitors (1-(2-Benzo[*b*]thiophenylmethyl)isatin-5-carboxamid) konnte von den Autoren gezeigt werden, dass zwischen der Carbonylfunktion an C3-Position und dem Cystein 147 des aktiven Zentrums eine kovalente Bindung ausgebildet wird. In Testungen an verschiedenen Serin- und Cysteinproteasen, unter anderem Cathepsin B, konnten die Autoren nur mäßige Inhibitionen feststellen.

Über ein HTS von Lee et al.^[131] wurde mit 5-Nitroisatin ein potenter reversibler und kompetitiver Inhibitor für die Caspase-3, -6 und -7 gefunden. Diese Ergebnisse wurden von den Autoren zur Entwicklung von selektiveren Isatinsulfonamiden als Inhibitoren der Caspasen genutzt.

Chen et al.^[132] sowie Zhou et al.^[133] greifen die Klasse der Isatine auf und geben diese als geeignete Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} an. Bei Chen et al. werden aus der Klasse der Isatine das 1-(Benzothiophen-2-ylmethyl)-5-iodo-indol-2,3-dion (Substanz **11**) und das 1-(Benzothiophen-2-ylmethyl)-7-bromo-indol-2,3-dion als stärkste Inhibitoren aufgeführt. Testungen an weiteren Cystein- und Serinproteasen zeigten eine deutliche Selektivität. Nach Dockingstudien sprechen die Autoren lediglich von Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen dem Isatin und der Protease ausgebildet werden.

Auch Zhou et al. bekräftigen diese These der Bindung und bezeichnen die Isatine als reversible und nichtkovalente Inhibitoren. Gleichwohl geben die Autoren an, dass die getesteten Isatine eine geringere Inhibition zeigten, nachdem dem Assayansatz DTT zugefügt worden war, ohne dabei die Möglichkeit einer kovalenten Bindung zu diskutieren. Daher erschien es als sehr interessant diese Klasse in die Hitvalidierung mit einzubeziehen.

Das Cinanserin, Substanz **12**, ist bereits ein bekannter und gut untersuchter Serotoninrezeptorantagonist. Bei Chen et al.^[82] zeigten Cinanserin und auch das Cinanserinhydrochlorid sowohl an der SARS-CoV M^{pro} als auch an der HCoV-229E 3CL^{pro} IC₅₀-Werte um 5 μ M, während an der HRV-14 3C^{pro} bis zu einer Inhibitorkonzentration von 200 μ M keinerlei Hemmung zu verzeichnen war. Des Weiteren führen die Autoren auf, dass Cinanserin die Replikation von SARS-CoV und HCoV-229E in Zellkulturen herabsetzt. Dabei zeigte sich bei der Konzentration, die inhibitorische Aktivität aufweist, kein Anzeichen von Zytotoxizität. Somit erschien Cinanserin als eine geeignete Substanz für die weitere Entwicklung von Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro}.

Von den gleichen Autoren folgte eine Publikation zur Testung verschiedener Cinanserinanaloge.^[134] Interessanterweise wird in dieser Veröffentlichung das Cinanserin mit

einem IC_{50} -Wert von 323 μM geführt. Von den Autoren wird bis auf die Aussage, dass in den Testungen des Folgepapers ein anderes fluorimetrisches Substrat verwendet wurde, Dabcyl-KNSTLQSGLRKE-Edans statt Edans-VNSTLQSGLRK(Dabcyl)M, keine Stellung zu den deutlichen Unterschieden in den Ergebnissen genommen.

Somit erschien auch diese Substanz als wertvolle Testsubstanz im Zuge der Hitvalidierung.

In Tabelle 5.1 sind die Inhibitionswerte bei gegebenen Assaybedingungen aus der entsprechenden Literatur gelistet:

Tabelle 5.1: Literaturangaben zu den ausgewählten Testsubstanzen

Substanz	Literatur	Literatur ID	Inhibition	Assaybedingungen
1	Lu et al. ^[117]	Substanz 3	$IC_{50} = 0,3 \pm 0,05 \mu M$	[E] = 50 nM [S] = 6 μM (Dabcyl-Edans)
2	Blanchard et al. ^[118]	MAC-0030731	$IC_{50} = 7 \pm 3 \mu M$	[E] = 1 μM [S] = 100 μM (Abz-Tyr(NO ₂)) $K_m = 820 \pm 130 \mu M$
3	Tsai et al. ^[119]	Substanz 1	$IC_{50} = 3 \mu M$	[E] = 50 nM [S] = 6 μM (Dabcyl-Edans)
4	Kao et al. ^[120]	MP521	$K_i = 11 \pm 2 \mu M$	[S] = 5 μM (Dabcyl-Edans)
5	Kao et al. ^[120, 121]	MP576	$K_i = 2,9 \pm 0,3 \mu M$ $IC_{50} = 2,5 \mu M$	[S] = 5 μM (Dabcyl-Edans) HPLC-Assay: [E] = 200 nM [S] = 500 μM
6	Mukherjee et al. ^[122]	PJ07	Inhibition bei 10 μM = 30% $IC_{50} = 18,2 \mu M$	[E] = 5 μM [S] = 50 μM (Dabcyl-Edans), $K_m = 10,3 \pm 1,9 \mu M$

Substanz	Literatur	Literatur ID	Inhibition	Assaybedingungen
7	Mukherjee et al. ^[122]	PJ169	Inhibition bei 10 μ M = 40% $IC_{50} = 17,2 \mu$ M	[E] = 5 μ M [S] = 50 μ M (Dabcyl-Edans), $K_m = 10,3 \pm 1,9 \mu$ M
8	Liu et al. ^[124]	C3930	Inhibition bei 40 μ M = 43% $K_i = 61 \pm 6 \mu$ M	HPLC-Assay: [E] = 1,8 μ M [S] = 1,6 mM
9	Liu et al. ^[127] Hsu et al. ^[135]	Hexachlorophen	$K_i = 4 \mu$ M ^[127] $K_i = 13,7 \pm 0,4 \mu$ M ^[135]	Liu et al.: [E] = 20 nM [S] = 30 μ M (Abz-Dnp) $K_m = 16 \pm 1,1 \mu$ M Hsu et al.: [E] = 50 nM [S] = 8-80 μ M (Dabcyl-Edans)
10	Shie et al. ^[81]	Substanz 2a	$IC_{50} = 0,06 \mu$ M $K_i = 0,03 \mu$ M	[E] = 50 nM [S] = 6 μ M (Dabcyl-Edans)
11	Chen et al. ^[132]	Substanz 4o	$IC_{50} = 0,95 \mu$ M	[E] = 50 nM [S] = 6 μ M (Dabcyl-Edans)
12	Chen et al. ^[82] Yang et al. ^[134]	Cinanserin Substanz 1	$IC_{50} = 5 \mu$ M ^[82] $IC_{50} = 323 \mu$ M ^[134]	[E] = 1 μ M [S] = 10 μ M (Dabcyl-Edans)

Diese Werte sollten nun nach dem hier entwickelten Arbeitsablauf verifiziert werden.

5.2 Ergebnisse der Testungen

In Tabelle 5.2 sind die Inhibitionen [%] der verschiedenen Testsubstanzen zum einem nach dem Standardassay und zum anderen nach Testung auf falsch positive Ergebnisse gelistet. Tabelle 5.3 gibt die IC_{50} -Werte an.

Tabelle 5.2: Messen der Inhibition der verschiedenen Testsubstanzen bei einer Konzentration von 20 μM

Prozent [%] Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM ¹⁾					
Inhibitor	Ohne Korrektur	Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von Triton X-100 (0,01%) und Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von DTT (700 μM)
1	99,2 $\pm 0,17$	99,2 $\pm 0,17$	93,6 $\pm 1,83$	93,5 $\pm 1,73$	15,5 $\pm 5,52$
2	24,2 $\pm 5,24$	24,0 $\pm 2,44$	5,25 $\pm 3,21$	5,40 $\pm 4,92$	19,4 $\pm 4,40$
3	41,1 $\pm 5,04$	42,2 $\pm 4,66$	3,53 $\pm 3,11$	4,94 $\pm 4,08$	40,3 $\pm 17,3$
4	30,4 $\pm 3,36$	23,6 $\pm 5,73$	15,2 $\pm 6,02$	7,22 $\pm 2,87$	18,0 $\pm 7,30$
5	32,5 $\pm 7,78$	30,3 $\pm 16,52$	34,9 $\pm 24,19$	31,7 $\pm 28,59$	11,6 $\pm 2,31$
6	12,5 $\pm 5,16$	13,7 $\pm 11,37$	10,6 $\pm 5,87$	11,9 $\pm 11,11$	6,68 $\pm 4,78$
7	16,5 $\pm 5,51$	Fluoreszenz ²⁾	k.l. ³⁾	Fluoreszenz	15,3 $\pm 5,52$
8	73,4 $\pm 6,50$	76,3 $\pm 5,24$	14,2 $\pm 1,38$	23,0 $\pm 3,37$	67,0 $\pm 13,79$
9	19,3 $\pm 3,24$	17,4 $\pm 4,66$	12,8 $\pm 6,02$	10,9 $\pm 4,46$	22,9 $\pm 4,20$
10	29,3 $\pm 4,80$	23,1 $\pm 5,66$	2,39 $\pm 2,52$	k.l.	25,0 $\pm 8,19$
11	95,0 $\pm 0,42$	94,7 $\pm 0,42$	93,5 $\pm 0,21$	93,1 $\pm 0,21$	68,7 $\pm 2,47$
12	26,4 ⁴⁾ $\pm 0,78$	6,85 ⁴⁾ $\pm 1,01$	20,9 ⁴⁾ $\pm 0,64$	k.l. ^{3),4)}	23,5 ⁴⁾ $\pm 1,70$

¹⁾Mittelwert aus vier Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung (= Standardabweichung der Einzelwerte) angegeben. Eine Tabelle mit den jeweiligen Einzelwerten ist dem Anhang zu entnehmen. ²⁾Autofluoreszenz von Inhibitoren ($f_{\text{corr}} < 1$) verschiebt den Achsenabschnitt beim Umsatz-Zeit-Diagramm, beeinträchtigt die Hydrolyserate jedoch nicht.^[100]

³⁾k.l.= keine Inhibition messbar, ⁴⁾Prozent [%] Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μM

Tabelle 5.3: IC₅₀-Werte der Testsubstanzen

IC ₅₀ -Werte [μM] ¹⁾				
Inhibitor	Ohne Korrektur	Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von Triton X-100 (0,01%) und Korrektur mit f_{corr}
1	5,30	5,12	7,20	7,16
	$\pm 0,23$	$\pm 0,24$	$\pm 1,31$	$\pm 1,41$
2	53,4	55,7	317,1	264,1
	$\pm 13,1$	$\pm 18,4$	$\pm 153,8$	$\pm 209,2$
3	16,5	15,8	101,4	88,8
	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 3,3$	$\pm 9,5$
4	49,5	58,4	431,8	irregulärer Verlauf der Kurve
	$\pm 1,1$	$\pm 5,7$	$\pm 6,0$	Keine Auswertung möglich
5	17,9	18,4	18,9	(21,4)
	$\pm 6,6$	$\pm 0,7$	$\pm 1,1$	$\pm 2,5$
6	132,9	163,6	378,3	477,7
	$\pm 2,4$	$\pm 5,3$	$\pm 18,2$	$\pm 94,8$
7	39,1	Fluoreszenz ²⁾	329,5	Fluoreszenz ²⁾
	$\pm 2,1$		$\pm 33,3$	
8	17,4	Fluoreszenz ³⁾	70,1	Fluoreszenz ³⁾
	$\pm 0,9$		$\pm 12,2$	
9	60,9	63,2	75,6	79,2
	$\pm 3,2$	$\pm 2,9$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$
10	35,0	38,3	107,1	irregulärer Verlauf der Kurve
	$\pm 7,0$	$\pm 7,7$	$\pm 31,5$	Keine Auswertung möglich
11	0,451	0,393	0,481	0,418
	$\pm 0,025$	$\pm 0,025$	$\pm 0,007$	$\pm 0,003$
12	459,0	---	---	---
	$\pm 17,7$			

¹⁾Zur deutlicheren Darstellung sind hier jeweils die Mittelwerte aus zwei (teilweise drei) Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung (= Standardabweichung der Einzelwerte) angegeben. Eine Tabelle mit den jeweiligen Einzelwerten ist dem Anhang zu entnehmen. ²⁾Autofluoreszenz von Inhibitoren ($f_{\text{corr}} < 1$) verschiebt den Achsenabschnitt beim Umsatz-Zeit-Diagramm, beeinträchtigt die Hydrolyserate jedoch nicht. ³⁾Hier scheinen statt der Fluoreszenz der Substanz auch Streuungseffekte an den Aggregaten möglich zu sein.

Die erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten zur Aggregation, zum inneren Filtereffekt und zu kovalenten Bindern hinsichtlich ihrer Aussagekraft eingehender diskutiert.

5.2.1 Prozent Inhibition und IC_{50} -Werte der potenziellen SARS-CoV M^{pro} Inhibitoren

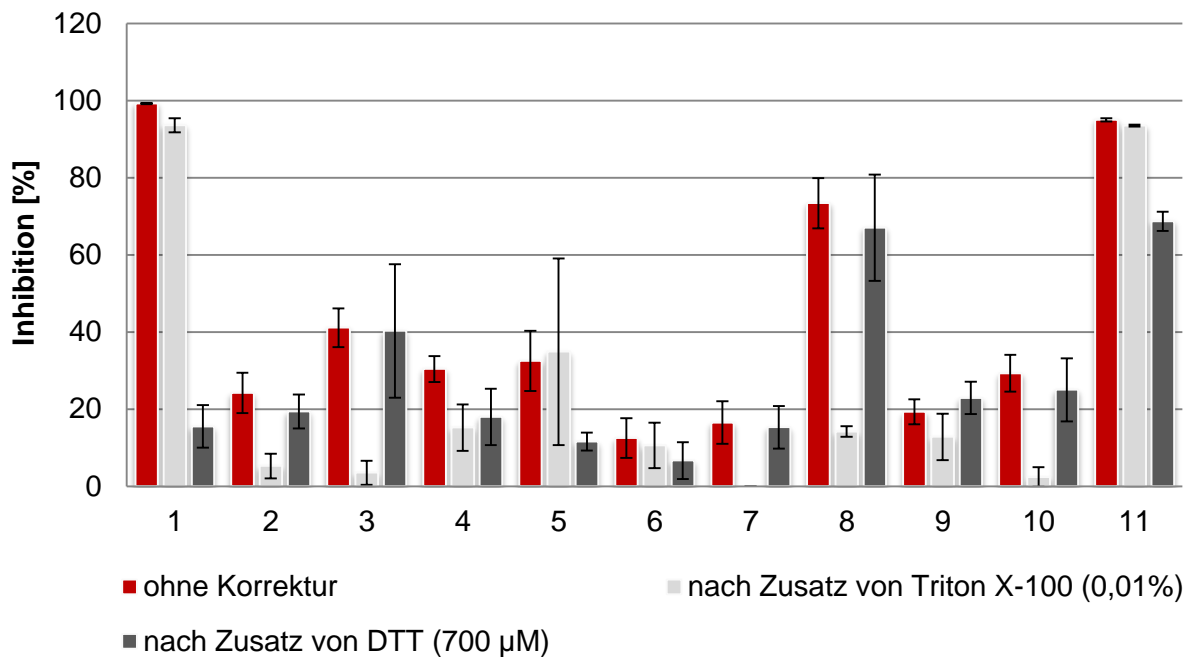


Abbildung 5.1: Graphische Darstellung der Inhibition der Testsubstanzen 1-11 (siehe Tabelle 5.2). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (= Standardabweichung der Einzelwerte)

Abbildung 5.1 und Tabelle 5.2 zeigen, dass der überwiegende Anteil der getesteten Substanzen falsch positive Ergebnisse in Folge von Aggregation vorweist. Substanz **2**, **3**, **7**, **8** und **10** zeigen bei einer Konzentration von 20 µM einen deutlichen Effekt bei Zugabe von Triton X-100. Ebenso lässt sich auch hier bereits abschätzen, dass es sich bei Substanz **1**, **5** und **11** möglicherweise um kovalente Inhibitoren handelt.

Bei der potenziell aggregierenden Substanz **3** ergibt sich ein relativ hoher Fehlerbalken für die Messungen nach Zusatz von DTT. Dieser Aspekt zeigte sich bei den weiteren Testsubstanzen nicht, sodass hier von einem Einzelfall von hoher Streuung der Werte auszugehen ist. Ebenso weist Substanz **5** als potenziell kovalenter Inhibitor einen hohen Fehlerbalken bei den Messungen nach Zusatz von Triton X-100 auf. Dies könnte auf eine hohe Empfindlichkeit der Messung auf den Triton X-100 Zusatz schließen. Möglicherweise

spielt hier die Probenvorbereitung eine Rolle. Ein Einfluss der Zeit der Probenvorbereitung wurde im Zuge der Messungen jedoch nicht überprüft.

Wie in Kapitel 4.1 bereits erwähnt, dient die Messung der Inhibition [%] bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM zunächst dazu, geeignete Konzentrationen für die IC_{50} -Wert Bestimmung zu wählen.

In Abbildung 5.2 sind die Ergebnisse der IC_{50} -Wert Bestimmungen zur Verdeutlichung des Effektes des Zusatzes von Triton X-100 (0,01%) nochmals graphisch dargestellt:

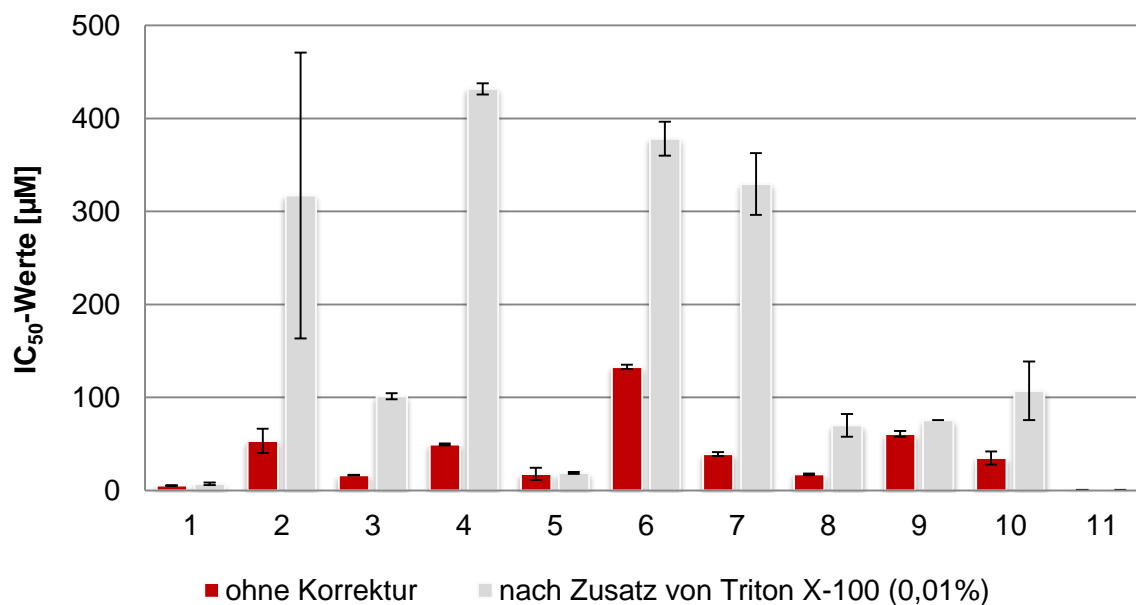


Abbildung 5.2: Darstellung der IC_{50} -Werte der Testsubstanzen 1-11 (siehe Tabelle 5.3). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (= Standardabweichung der Einzelwerte).

In Abbildung 5.2 zeigt sich für die Messungen von Substanz 2 unter Zusatz von Triton X-100 eine große Streuung der Werte. Hier scheint die Aggregation dieser Substanz bei den unterschiedlichen Messungen sehr empfindlich auf die Reaktionsbedingungen zu reagieren. Auch hier könnte die Zeit der Probenvorbereitung wieder eine Rolle spielen.

5.2.2 Detektierbare Aggregation

Wie vor allem in Abbildung 5.2 deutlich wird, zeigten die meisten der getesteten Substanzen einen deutlichen Anstieg des IC_{50} -Wertes nach Zusatz von Triton X-100 (0,01%). Hier handelte es sich folglich um eine unspezifische Hemmung durch Aggregation. Um diese unspezifische Hemmung weiter zu verdeutlichen, wurden zusätzlich erste Selektivitätstestungen am Cathepsin B für ausgewählte Inhibitoren durchgeführt. Die

Ergebnisse, in Tabelle 5.4 dargestellt, zeigen, dass die meisten Testsubstanzen ebenfalls eine hohe Inhibition [%] an Cathepsin B aufweisen. Dies könnte zusätzlich ein Hinweis auf unspezifische Effekte wie etwa die Aggregation sein.

Tabelle 5.4: Testung aggregierender Substanzen in einer Konzentration von 100 μ M am Cathepsin B

Substanz [100 μ M]	Inhibition [%] (Testung an CathB) ¹⁾
1	106,1 \pm 2,40
2	60,1 \pm 5,34
3	72,8 \pm 6,22
4	48,8 \pm 2,48
5	k.l. ²⁾
6	39,7 \pm 0,64
7	76,0 \pm 1,70

¹⁾Mittelwert aus zwei bzw. vier Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung (=Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang ²⁾k.l. = keine Inhibition messbar

Weiterhin wurden zur Verifizierung der Aggregation DLS-Testungen durchgeführt. Dazu wurden die Inhibitoren jeweils bei einer Konzentration, die ungefähr dem IC₅₀-Wert entspricht, vermessen. Die Ergebnisse der DLS-Testungen sind Tabelle 5.5 zu entnehmen:

Tabelle 5.5: Ergebnisse der DLS-Testungen von ausgewählten Substanzen

Substanznummer und verwendete Konzentration in μ M	mittlere Größe [nm]
2 (90 μ M)	303-1288
3 (16 μ M)	1392
7 (85 μ M)	1967
8 (40 μ M)	1637
9 (60 μ M)*	120
10 (25 μ M)	1480

* Bei einer Konzentration von 10 μ M mit Assaybedingungen nach Liu et al.^[127] wurden Aggregate in einer Größenordnung von 60 bis 350 nm detektiert

Die Ergebnisse der DLS-Testungen haben gezeigt, dass die Substanzen, bei denen aufgrund der Resultate der vorangegangenen Messungen Aggregation vermutet wurde, im Allgemeinen Aggregate von deutlicher Größe aufwiesen. Allein das Hexachlorophen,

Substanz **9**, zeigt mit einer mittleren Größe von 120 nm einen Wert unter 1 µm. Inwieweit diese Substanz aggregiert, durch andere Mechanismen als Inhibitor fungiert oder eine Inhibition vortäuscht wird in Kapitel 5.3.3 eingehender diskutiert.

5.2.3 Prüfen des inneren Filtereffektes

Bei den betrachteten Substanzen kam der innere Filtereffekt aufgrund der gewählten Konzentrationen kaum zum Tragen. Zwar erschien aufgrund der Eigenfärbung von Substanz **1**, **10** und vor allem **11** eine starke Verfälschung der Ergebnisse möglich, diese Vermutung bestätigte sich jedoch nicht nach Bestimmung der Korrekturfaktoren. Substanz **10** zeigte ein Absorptionsmaximum im Bereich der Anregungswellenlänge. Dennoch wiesen die betrachteten Konzentrationen keine großen Korrekturfaktoren auf. Der innere Filtereffekt wirkt sich stärker bei Substanzen aus, die im Bereich der Detektionswellenlänge absorbieren. Unter diesen Voraussetzungen wurde das Diarylsulfon (Substanz **1**) sowie das Isatin (Substanz **11**) genauer untersucht.

Substanz **1** weist eine gelbe Färbung auf. Da der IC₅₀-Wert dieser Substanz um 5 µM liegt, sind die Lösungen, die für die Testung verwendet wurden, in niedrigeren Konzentrationsbereichen, sodass hier kaum eine Färbung zu verzeichnen ist und damit kein signifikanter innerer Filtereffekt auftritt. Der Korrekturfaktor ist hier vernachlässigbar.

Substanz **11** ist stark orange gefärbt, hemmt jedoch ebenso in solch starkem Ausmaße, dass so niedrige Konzentrationen für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes verwendet wurden, wodurch die Korrekturfaktoren für die betrachteten Konzentrationen nahe dem Wert 1 lagen.

5.2.4 Detektierbare kovalente Bindungen

Wie die Ergebnistabellen (Tabelle 5.2 und 5.3) und Abbildung 5.1 zeigen, scheinen die Substanzen **1**, **5** und **11** eine kovalente Bindung zur Protease auszubilden. Bei diesen drei Substanzen handelt es sich um Inhibitoren, die in den Testungen die niedrigsten IC₅₀-Werte aufwiesen.

Um letztlich eine kovalente Bindung zwischen Enzym und Inhibitor zu verifizieren, steht als Messtechnik die Massenspektrometrie zur Verfügung. Einige der getesteten Inhibitoren wurden vom Arbeitskreis Schirmeister in Würzburg mittels der Massenspektrometrie untersucht.

Interessant war dabei, dass sich im Massenspektrum von Substanz **1** zeigte, dass nur ein Teil der Substanz kovalent an das aktive Zentrum bindet. Die im Vergleich zur massenspektrometrischen Untersuchung des reinen Enzyms gefundene Massendifferenz entsprach dabei exakt dem 1,3-Dinitro-5-(trifluoromethyl)phenyl-Rest. Um diese Messung zu

verifizieren sollten weitere Untersuchungen zur Umsetzung von Substanz **1** mit der SARS-CoV M^{pro} durchgeführt werden, um eine klare Aussage zum Mechanismus dieses Inhibitors treffen zu können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich in Kapitel 5.3.1 finden.

5.2.5 Reversibilität und Irreversibilität der Bindung

Ausgewählte Substanzen wurden auch hinsichtlich der Reversibilität bzw. Irreversibilität ihrer Hemmung untersucht. In den folgenden Abbildungen (5.3-5.5) sind die Ergebnisse der Dialyse für Substanz **1** zu sehen. Die Dialyse wurde dabei entsprechend Kapitel 4.5.1 durchgeführt.

Es lässt sich deutlich erkennen, dass sich bei den untersuchten Konzentrationen zwischen 5 und 50 μM keinerlei Veränderung hinsichtlich der Steigung der Geraden und damit in der Enzymrestaktivität bzw. Inhibition innerhalb des betrachteten Zeitraumes ergibt.

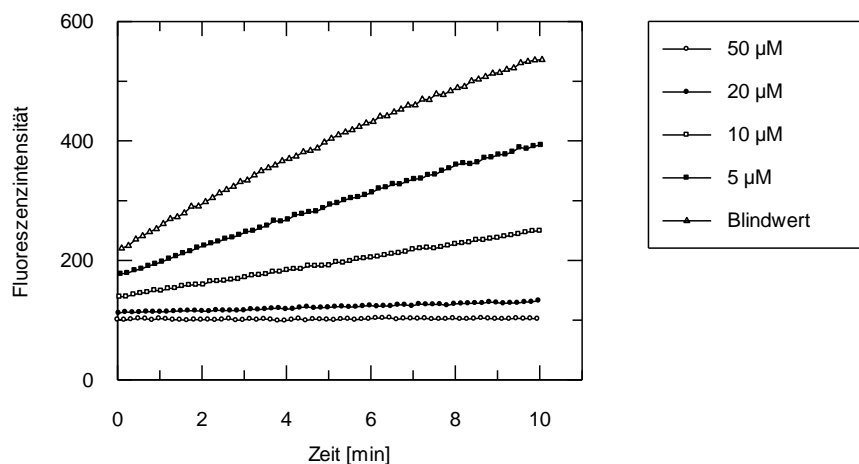


Abbildung 5.3: Messen der Enzymaktivität nach 0 min Dialyse für Substanz **1**

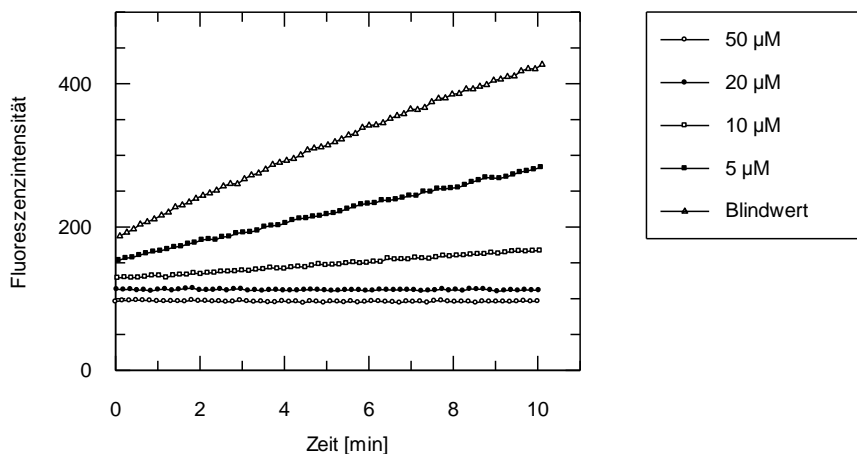


Abbildung 5.4: Messen der Enzymaktivität nach 120 min Dialyse für Substanz 1

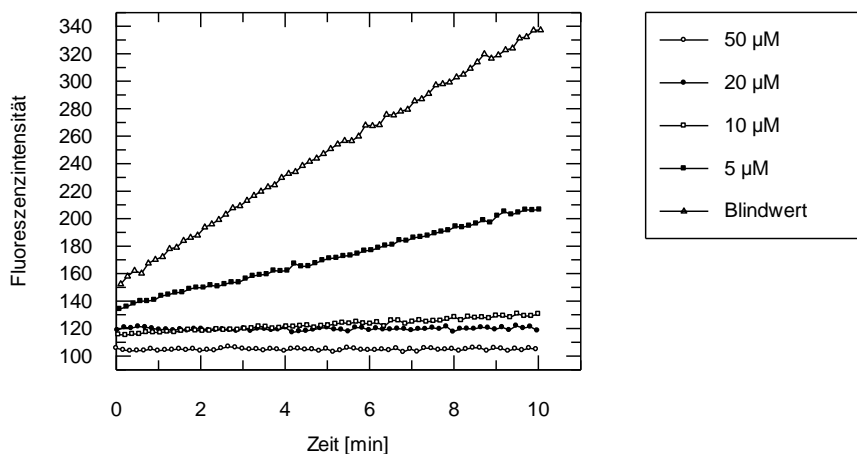


Abbildung 5.5: Messen der Enzymaktivität nach 300 min Dialyse für Substanz 1

Ebenso wurde Substanz **11** mittels Dialyse untersucht. Hier ergab sich im Gegensatz zu Substanz **1** eine reversible Kinetik. Die Darstellung dieses Ergebnisses erfolgt in Kapitel 5.3.5 im Rahmen der Diskussion zu weiteren speziellen Testungen dieser Substanz.

5.3 Spezielle Untersuchungen zum Inhibitionsmechanismus ausgewählter Testsubstanzen

5.3.1 Diarylsulfone

Die Testungen im Rahmen des Arbeitsablaufs ließen die Vermutung zu, dass das Diarylsulfon kovalent an die SARS-CoV M^{pro} bindet. Eingehende Untersuchungen mittels Massenspektrometrie des Arbeitskreises Schirmeister an der Universität Würzburg

bestärkten diese These. Dabei zeigte sich jedoch in den Massenspektren, dass anscheinend nicht das komplette Molekül kovalent bindet, sondern dass nur der Dinitrotrifluoromethylphenylrest an das Cystein des aktiven Zentrums bindet.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren und zu klären, nach welchem Mechanismus diese Substanz bindet und welche Produkte dabei entstehen, wurden weitergehende HPLC-Testungen durchgeführt.

Dabei wurde mit DTT als Thiol donor und Ersatz für die Cysteinprotease gearbeitet.

Das DTT wurde im gleichen Verhältnis mit dem Diarylsulfon (Konzentration je 1mg/ml) in Acetonitril versetzt und gelöst. Diese Lösung wurde anschließend zunächst an einer HPLC mit RP-18 Säule und UV-Detektor bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm über einen Zeitraum von 30 Minuten untersucht. Als mobile Phase diente dabei ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser im Verhältnis 50:50 mit einer Flussrate von 1 ml/min.

Als Vergleichslösungen wurden jeweils die reinen Edukte in Acetonitril gelöst (1 mg/ml) und gemessen.

Die Lösung des Diarylsulfons, das mit DTT versetzt wurde, zeigte im Chromatogramm vier Peaks, die deutlich voneinander getrennt vorlagen. Nach den Chromatogrammen aus den HPLC-Läufen mit den Eduktlösungen, ließ sich im Chromatogramm der Mischung eindeutig erkennen, welche Peaks den Eduktresten zuzuordnen sind (Retentionszeiten von $t_r = 1,15$ min und $t_r = 20,25$ min). Die Herkunft der verbliebenen zwei Peaks bei den Retentionszeiten von $t_r = 4,01$ min und $t_r = 8,63$ min sollte daraufhin geklärt werden.

Nach der Methodenentwicklung an der HPLC mit einem UV-Detektor, sollte die Methode ebenso an einer HPLC mit DAD-Detektor übertragen werden, um so die Möglichkeit zu haben, bei verschiedenen Wellenlängen zu detektieren und möglicherweise für die beiden verbliebenen Peaks über das Absorptionsverhalten Hinweise auf die Identität zu erlangen. Dabei wurden die Chromatogramme bei 205, 215, 254 und 285 nm aufgenommen.

Die folgenden Abbildungen (5.6-5.8) zeigen die Chromatogramme für die reinen Edukte und das Gemisch bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm:

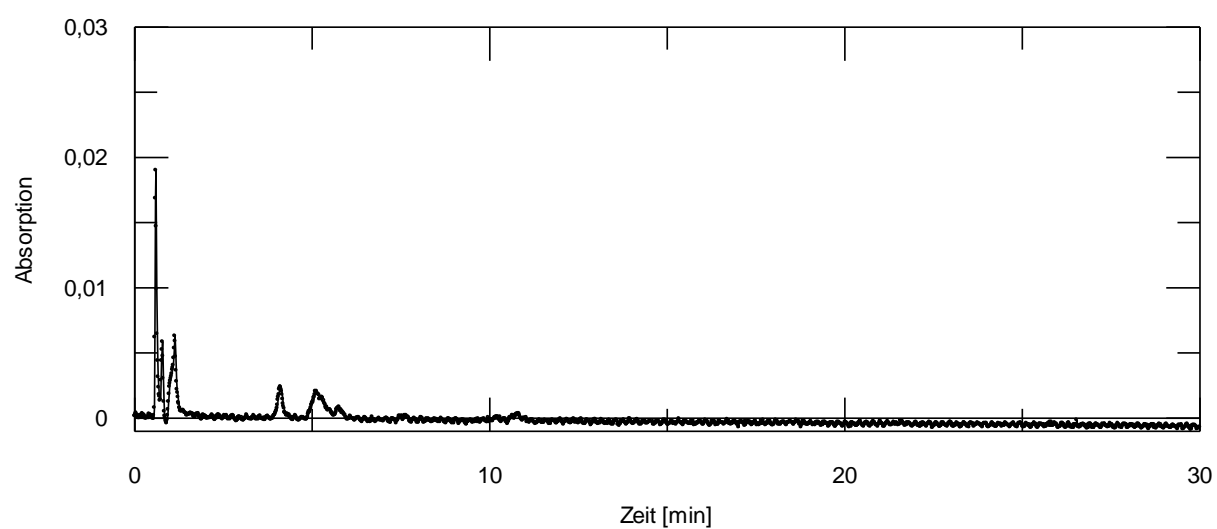


Abbildung 5.6: Chromatogramm der reinen DTT-Lösung (1mg/ml)

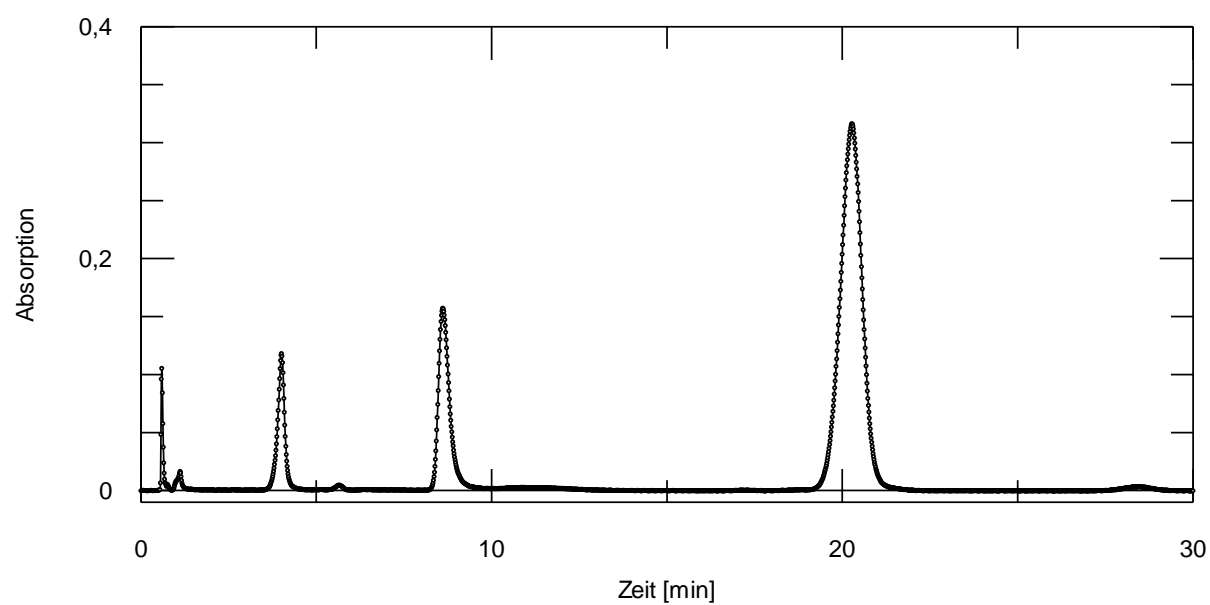


Abbildung 5.7: Chromatogramm des Gemisches aus DTT (1mg/ml) und Substanz 1 (1mg/ ml)

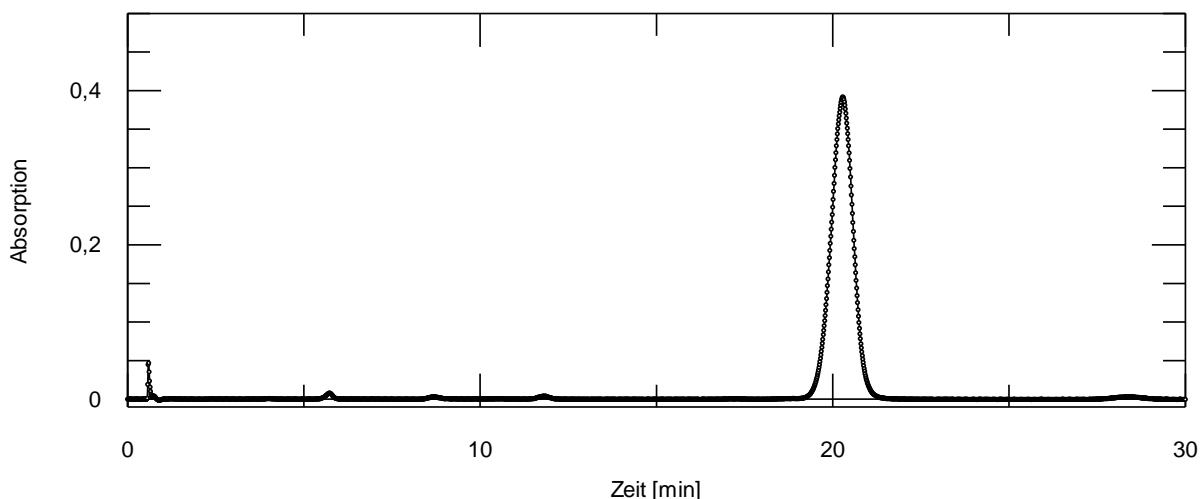


Abbildung 5.8: Chromatogramm der reinen Substanz 1 (1mg/ml)

Anschließend wurden für die einzelnen Edukte, DTT und Substanz 1, UV-Spektren in Acetonitril als Lösemittel aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass bei der gewählten Detektionswellenlänge von 254 nm keine Absorption des DTTs vorliegt (Abbildung 5.9), während Substanz 1 eine merkliche Absorption bei dieser Wellenlänge aufweist (Abbildung 5.10).

Daher erscheinen im Chromatogramm der DTT-Lösung lediglich der Totzeitpeak und noch einige geringfügige Verunreinigungen unbekannter Struktur.

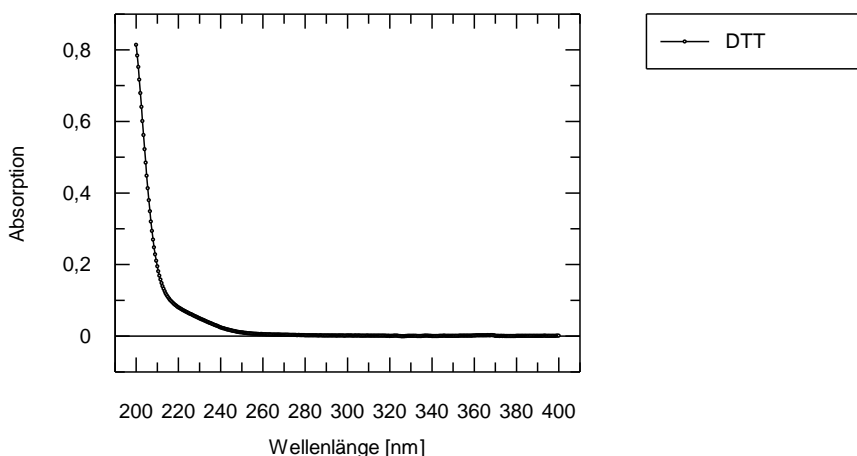


Abbildung 5.9: UV-Spektrum von DTT in Acetonitril

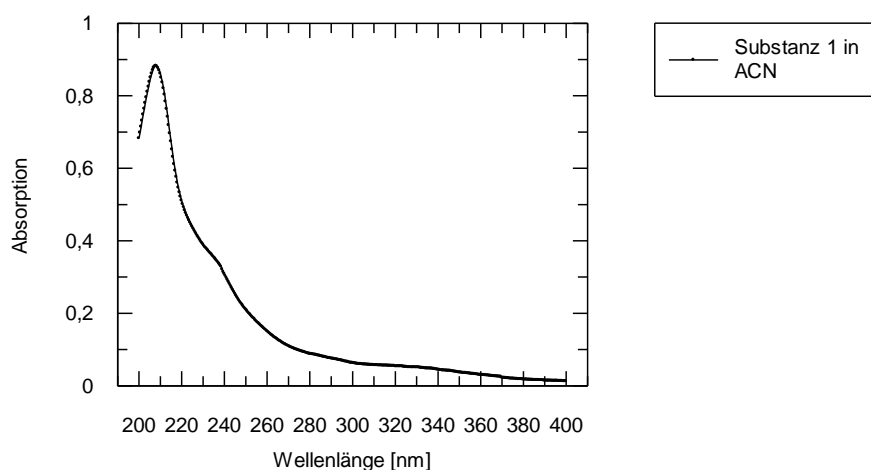


Abbildung 5.10: UV-Spektrum von Substanz 1 in Acetonitril

Für weitere Untersuchungen wurden die Fraktionen an der präparativen HPLC getrennt. Die Methode konnte dabei aufgrund der Tatsache, dass ebenfalls eine RP-18-Säule verwendet wurde und dass die Peaks hinreichend voneinander im Chromatogramm getrennt vorlagen, direkt von der analytischen HPLC übertragen werden. Einzig die Flussrate änderte sich auf 40 ml/min.

Dazu wurde ein Ansatz von je 60 mg Diarylsulfon und DTT in 12 ml Acetonitril hergestellt und vollständig gelöst.

Diese Lösung wurde anschließend filtriert und auf vier Läufe aufgeteilt. Nach zwei Läufen wurde die Säule mit reinem Acetonitril nachgespült, um zu vermeiden, dass auf der Säule verbliebene Substanzreste die einzelnen Fraktionen verunreinigen.

Die jeweils gleichen Fraktionen aus den vier Läufen wurden anschließend vereinigt und alle erhaltenen vier Fraktionen wurden unter möglichst schonenden Bedingungen (bei 40°C) bis zur Trockne einrotiert.

Die getrockneten Substanzen wurden nun der NMR-Analytik und der Massenspektrometrie unterzogen.

Dabei zeigte sich, dass in der Fraktion, die den zweiten Peak ($t_r = 4,01$ min) im Chromatogramm (Abbildung 5.7) darstellt, sowohl der Sulfinssäurerest als Produkt aus der Umsetzung des DTTs mit dem Diarylsulfon als auch dessen Oxidationsprodukt, die Sulfonsäure zu finden war. Als weiteres Produkt wurde das Addukt aus DTT und dem Dinitrotrifluoromethylphenylrest in der Fraktion des dritten Peaks ($t_r = 8,63$ min) des Chromatogramms (Abbildung 5.7) gefunden. Erwartungsgemäß wurden die Eduktreste des Diarylsulfons im vierten Peak ($t_r = 20,25$ min, siehe Abbildung 5.7) gefunden.

xt03425 #186-296 RT: 4.96-7.88 AV: 111 NL: 2.43E7
T: +c EI Full ms [39.50-1000.50]

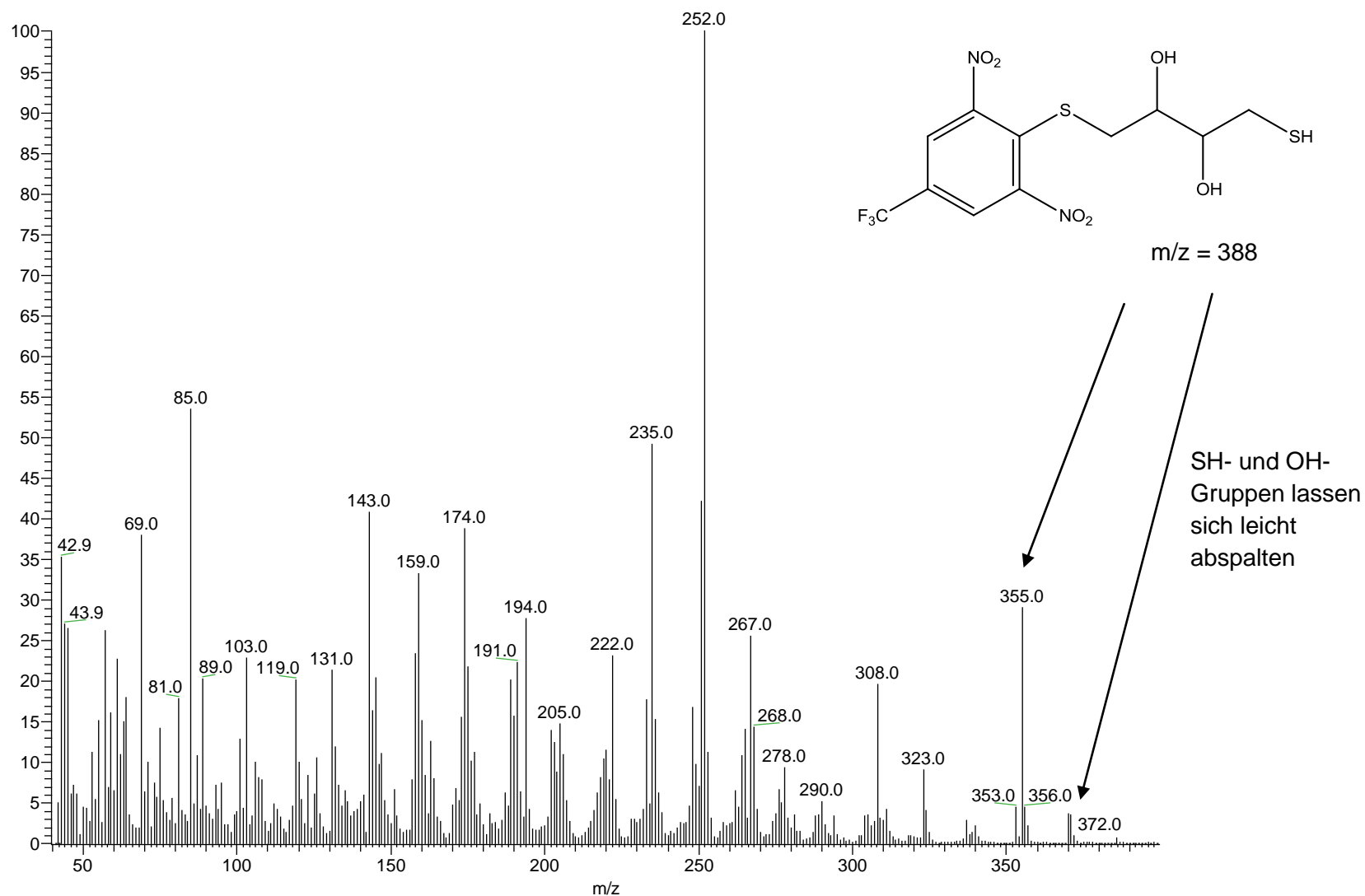


Abbildung 5.11: Massenspektrum der Fraktion aus dem dritten Peak ($t_r = 8,63$ min) des HPLC-Chromatogramms

5 Anwendung des erarbeiteten Arbeitsablaufs auf die SARS-CoV Hauptprotease

LTQOT00506 #73-199 RT: 1.91-2.67 AV: 127 NL: 8.84E6
T: ITMS - p NSI E Full ms [120.00-2000.00]

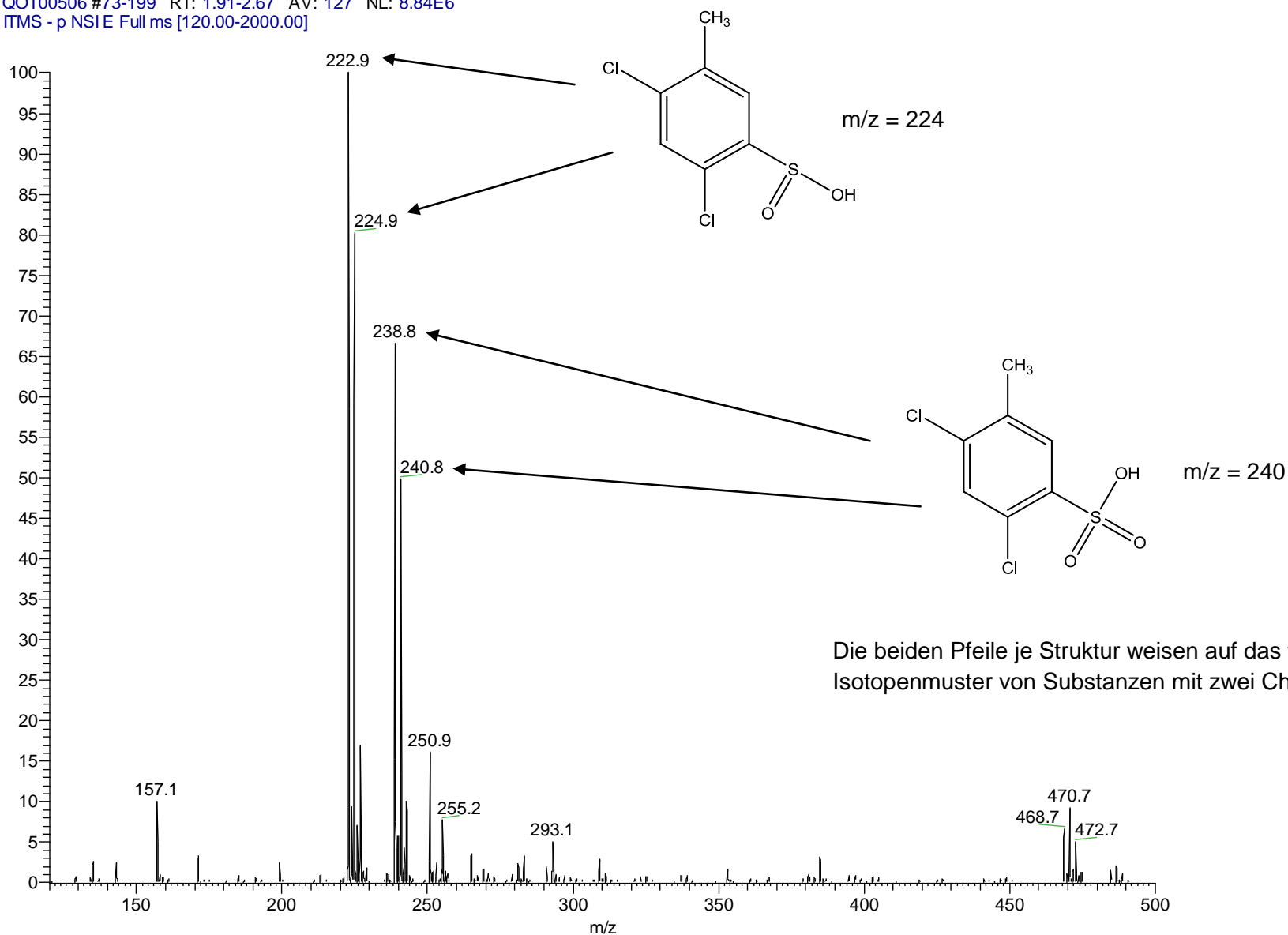


Abbildung 5.12: Massenspektrum der Fraktion aus dem zweiten Peak ($t_r = 4,01$ min) des HPLC-Chromatogramms

Aus diesen Ergebnissen wurde folgender Reaktionsmechanismus, entsprechend einer nucleophilen Substitution am Aromaten, für die Umsetzung an einer Cysteinprotease geschlossen:

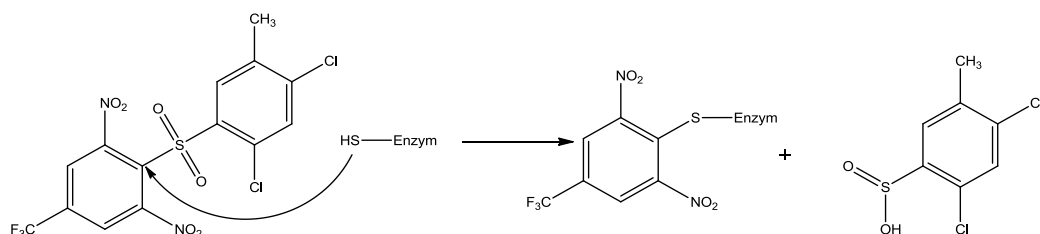


Abbildung 5.13: Reaktionsmechanismus der Umsetzung des Diarylsulfons an der SARS-CoV M^{pro}

Testungen an der SARS-CoV M^{pro} mit weiteren Vertretern dieser Substanzgruppe sollten Aufschluss über mögliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen geben. Dabei wurden sechs Substanzen mit unterschiedlichen Substitutionsmustern untersucht:

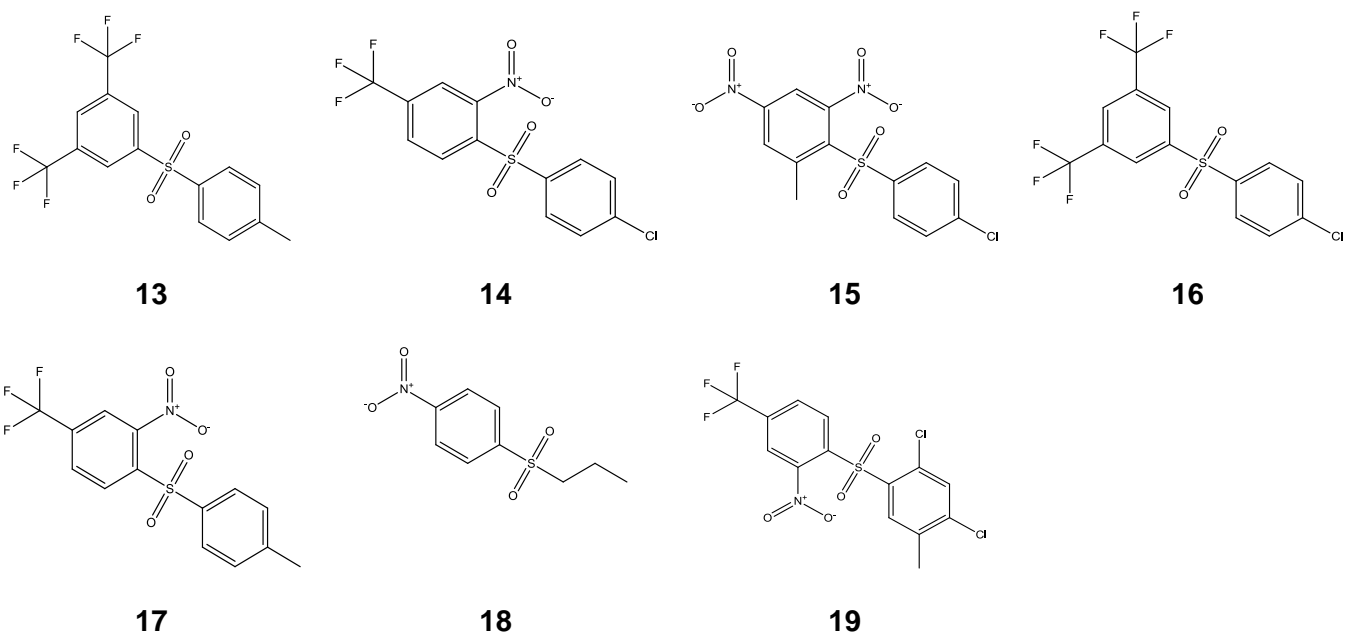


Tabelle 5.6: Ergebnisse der Testungen weiterer Diarylsulfone an der SARS-CoV M^{pro} 1)

Inhibitor	Prozent Inhibition [%]	Unter DTT-Zusatz [%]
13	51,3 ± 3,96 (100 µM) keine Inhibition (20 µM)	17,8 ± 1,70 (100 µM) 4,55 ± 0,64 (20 µM)
14	28,5 ± 2,40 (100 µM) 4,95 ± 1,48 (20 µM)	25,7 ± 2,62 (100 µM) 2,70 ± 0,28 (20 µM)
15	84,8 ± 1,27 (100 µM) 46,2 ± 0,63 (20 µM)	37,1 ± 1,55 (100 µM) 8,50 ± 1,55 (20 µM)
16	47,4 ± 2,05 (100 µM) 11,2 ± 1,63 (20 µM)	13,8 ± 5,02 (100 µM) keine Inhibition (20 µM)
17	24,0 ± 0,64 (100 µM) 28,1 ± 3,75 (20 µM)	16,0 ± 0,71 (100 µM) keine Inhibition (20 µM)
18	6,60 ± 2,69 (100 µM) 12,4 ± 1,63 (20 µM)	0,25 ± 0,35 (100 µM) keine Inhibition (20 µM)
19	73,4 ± 4,23 (100 µM) ²⁾	57,5 ± 1,48 (100 µM)

¹⁾ zur deutlicheren Darstellung: Mittelwerte aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang

²⁾ bei diesem Wert: Mittelwert aus vier Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang

Die Ergebnisse zeigen, dass keine weiteren Verbesserungen hinsichtlich der Inhibition zu erzielen waren. Dies könnte daran liegen, dass die Reaktion mit dem Enzym, wie sie in Abbildung 5.13 dargestellt ist, schon bevorzugt durch das Substitutionsmuster von Substanz **1** abläuft. Durch die beiden Nitrogruppen jeweils in ortho-Position sowie den Trifluoromethylrest in para-Position zur Sulfongruppe, wird der nucleophile Angriff durch die Thiofunktion des Cysteins im aktiven Zentrum von den betrachteten Substanzen bereits am besten begünstigt. Substanz **19** unterscheidet sich nur dadurch von Substanz **1**, dass sie eine Nitrogruppe weniger aufweist. Dadurch wird die Reaktion schon deutlich geschwächt. Substanz **15** weist wiederum zwei Nitrogruppen auf. Eine davon in ortho- und eine weitere in para-Position. Dadurch wird ebenfalls der nucleophile Angriff begünstigt. Alle weiteren Substanzen zeigen keinerlei vergleichbare Aktivität. Der Effekt der Substituenten bestärkt somit die These des obigen Reaktionsmechanismus.

5.3.2 Calmidazoliumchlorid

Das Calmidazoliumchlorid erschien vor allem vor dem Hintergrund als interessante Testsubstanz, dass es eine hohe Ähnlichkeit zu bereits bekannten starken Aggregatoren wie Miconazol oder Sulconazol besitzt.^[102]

Es erschien somit als sehr wahrscheinlich, dass auch diese Substanz falsch positive Ergebnisse liefert. Wie die Ergebnistabellen zeigen, wurde diese Vermutung bestätigt. Der Zusatz von Triton X-100 führte zu einer Abnahme der Inhibition bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM und damit folglich auch zu einer Erhöhung des IC_{50} -Wertes. Die IC_{50} -Kurven ohne Zusatz des Detergenz deuteten zudem bereits mit Werten zwischen 1,71 und 2,06 für den „slope factor“ auf eine potenziell aggregierende Substanz hin (siehe Anhang).

Die Vermessung einer Lösung von Calmidazoliumchlorid im verwendeten Assaypuffer mit Hilfe der DLS-Technik wies außerdem mit einer mittleren Größe von über 1 μm bei einer Inhibitorkonzentration von 40 μM (siehe Kapitel 5.2.2) deutlich auf diesen Fakt hin. Auch deutete die Michaelis-Menten-Kinetik auf eine nicht-kompetitive Kinetik hin (siehe Abbildung 5.14). Damit konnte auch bei dieser Substanz, nach Anwendung des Arbeitsablaufs, die in der Literatur beschriebene Hemmwirkung des Calmidazoliumchlorides (siehe Referenz^[124]) nicht bestätigt werden.

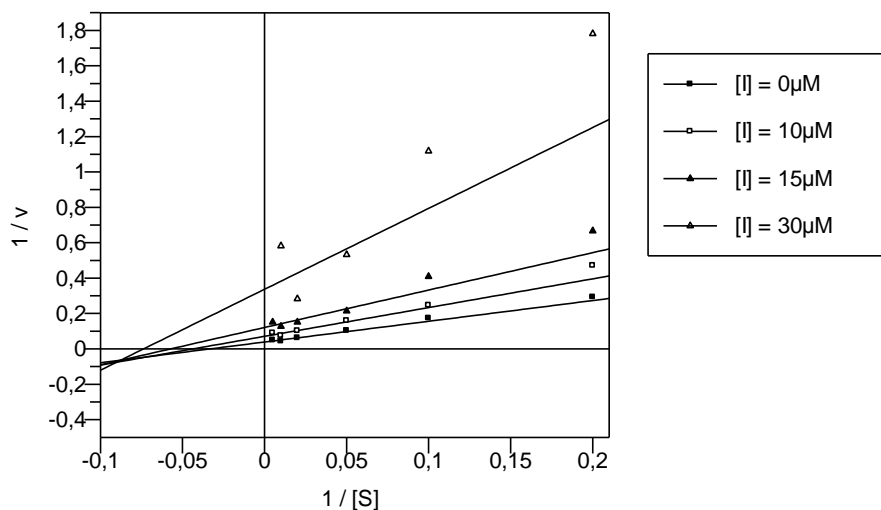


Abbildung 5.14: Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik von Calmidazoliumchlorid (Substanz 8) bei Konzentrationen von 0, 10, 15 und 30 μM

5.3.3 Hexachlorophen

Die Testergebnisse zeigen, dass sowohl die Inhibitionswerte bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM als auch die IC_{50} -Werte des Hexachlorophens keine Veränderung weder durch Triton X-100 noch durch einen DTT-Zusatz. Dies könnte zunächst den Schluss zulassen, dass es hier tatsächlich um eine richtig positive Inhibition des Hexachlorophens handelt. Liu et al.^[127] geben das Hexachlorophen als kompetitiven Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 5 μM an. Der in den Testungen nach den hiesigen Assaybedingungen gefundene Wert beträgt jedoch mit 61 μM ein Vielfaches. Um zu überprüfen, ob Hexachlorophen nach den hiesigen Bedingungen dennoch eine kompetitive Hemmung zeigt, wurden Michaelis-Menten-Kinetiken mit drei Inhibitorkonzentrationen (40, 60 und 100 μM) aufgenommen.

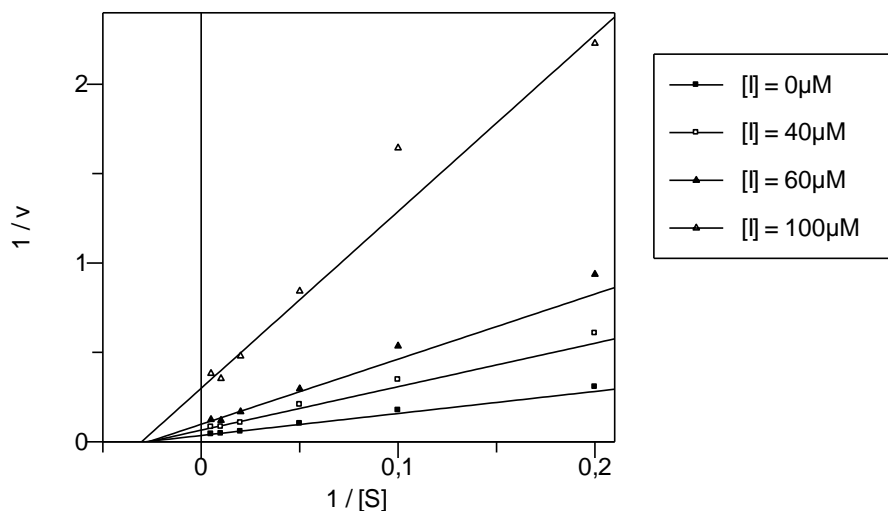


Abbildung 5.15: Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik des Hexachlorophens bei Konzentrationen von 0, 40, 60 und 100 μM .

Im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 5.15) ist zu erkennen, dass sich die Geraden nicht auf der Ordinate schneiden, wie es bei einer kompetitiven Hemmung, bei der nur der K_m bei gleichbleibendem v_{max} variiert, vorliegen sollte. Um zu überprüfen, ob es möglicherweise an den Versuchsbedingungen lag, wurden diese denen von Liu et al.^[127] weitestgehend angeglichen. Im Wesentlichen wurde dabei die DMSO-Konzentration im Assayansatz deutlich reduziert. Im Ansatz, der für den Arbeitsablauf verwendet wurde, beträgt der DMSO-Anteil 12,5 %.

Liu et al.^[127] verwenden Inhibitoren, die in 1% DMSO gelöst wurden. Daraufhin wurde der DMSO-Anteil im Assayansatz auf 1,75 % gesenkt (siehe experimenteller Teil). Diese Reduktion führte zu einer Senkung des IC_{50} -Wertes auf ungefähr 5 μM , wie es bei Liu et al.^[127] angegeben ist (Abbildung 5.16).

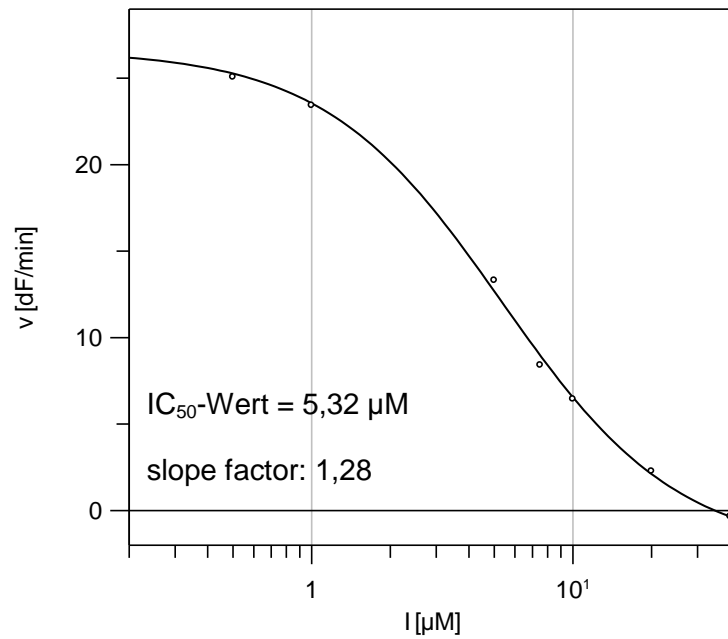


Abbildung 5.16: IC_{50} -Kurve des Hexachlorophens unter Assaybedingungen mit einem geringen DMSO-Anteil von 1,75% (siehe experimenteller Teil). Die Hexachlorophenkonzentrationen lagen dabei zwischen 0 und 40 μM .

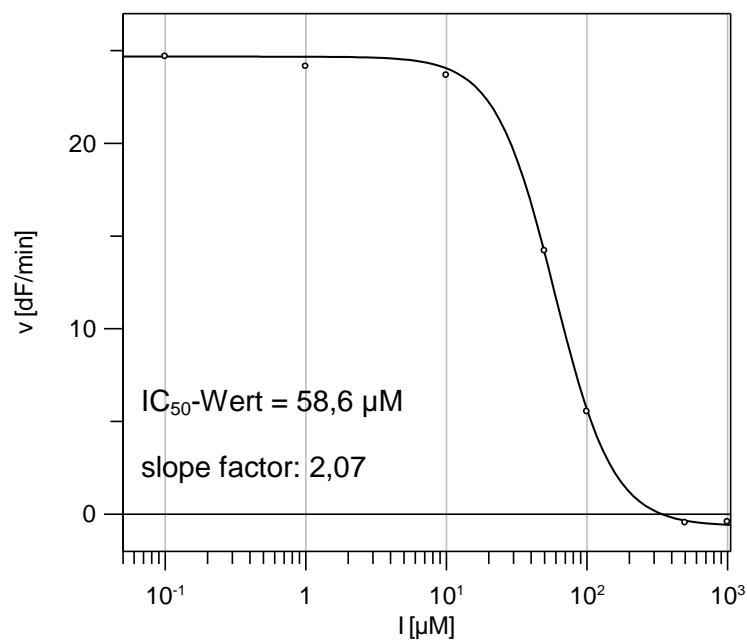


Abbildung 5.17: IC_{50} -Kurve des Hexachlorophens unter Assaybedingungen mit einem höheren DMSO-Anteil von 12,5% (Standardassaybedingungen für die SARS-CoV M^{pro} , siehe experimenteller Teil). Die Hexachlorophenkonzentrationen lagen dabei zwischen 0 und 1000 μM .

Die Michaelis-Menten-Kinetik basierend auf diesen Assaybedingungen zeigte jedoch wiederum keine kompetitive Hemmung. Auch eine zusätzliche Inkubationszeit nach Substratzugabe, wie sie bei Liu et al.^[127] beschrieben wird, veränderte dieses Ergebnis nicht (siehe Abbildung 5.18).

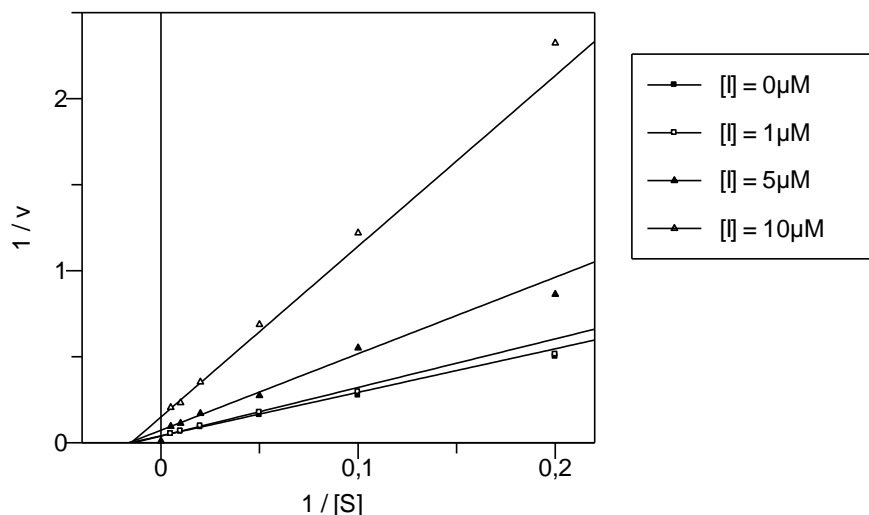


Abbildung 5.18: Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik des Hexachlorophens bei Konzentrationen von 0, 1, 5 und 10 µM. Dabei wurde der Assayansatz mit 1,75% DMSO verwendet und eine Inkubationszeit von 15 min nach Substratzugabe eingehalten.

Das erhaltene Diagramm und auch der slope factor der IC₅₀-Kurve, unter den Assaybedingungen mit 12,5 % DMSO-Anteil (Abbildung 5.17), weisen Merkmale auf, die auf einen aggregatbildenden Inhibitor schließen lassen.

Durch Zugabe von Triton X-100 wird der IC₅₀-Wert bei den Bedingungen mit 1,75% DMSO etwas höher. Dieser Unterschied ergab sich bei den Bedingungen mit 12,5 % DMSO-Anteil nicht.

Liu et al.^[127] geben zudem an, dass die kompetitive Hemmung zeitabhängig ist. Eine Zeitabhängigkeit der Inhibition konnte bei Betrachtung einer Inhibitorkonzentration von 10 µM in Anlehnung an die Testung von Liu et al. jedoch nicht festgestellt werden (Daten siehe Anhang). Ob es sich um einen aggregatbildenden Inhibitor handelt, wurde anschließend mit DLS-Testungen überprüft. Dabei wurden unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen gefunden. Zum Teil lagen die mittleren Partikelgrößen zwischen 100 und 300 nm und damit deutlich niedriger als bei den anderen aggregierenden Testsubstanzen (siehe Tabelle 5.5). Nur vereinzelt wurden auch noch größere Partikel gefunden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich beim Hexachlorophen nicht um einen aggregatbildenden Inhibitor handelt. Vielmehr scheint diese in Wasser unlösliche Substanz in Ansätzen mit einem geringeren DMSO-Anteil praktisch ausgefällt zu werden, welches zu einer unspezifischen

Hemmung des Enzyms führt. Daraus ergibt sich möglicherweise der um den Faktor 10 niedrigere IC_{50} -Wert bei Assaybedingungen mit 1,75 % DMSO im Assayansatz.

5.3.4 Anilid – Testung auf kompetitive Kinetik

Das getestete *p*-Nitroanilid (Substanz **10**) entstammt einer Veröffentlichung von Shie et al.^[81] In dieser Veröffentlichung wurde der Versuch unternommen, über die Struktur von kolorimetrischen Substraten geeignete kompetitive Inhibitoren für die SARS-CoV M^{pro} zu finden. Das hier betrachtete *p*-Nitroanilid, in der Veröffentlichung von Shie et al. als Substanz 2a bezeichnet, wird dabei als ein solcher kompetitiver Inhibitor beschrieben und mit einem IC_{50} -Wert von 0,06 μM und einem K_i von 0,03 μM angegeben. Dieses Ergebnis sollte nun verifiziert werden.

Dabei wurde diese Substanz im Arbeitskreis Schirmeister, Universität Würzburg, synthetisiert und für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Wie sich nach den ersten Testungen zeigte, konnte der IC_{50} -Wert im submikromolaren Bereich nicht verifiziert werden. Erste Überlegungen, es könnte möglicherweise am verwendeten Substrat liegen, konnten widerlegt werden. Auch der Einsatz eines FRET-Substrates mit der Kombination Dabcyl-EDANS als Donor-Akzeptor-Paar, wie es Shie et al. verwendet haben, führte nicht zu einer Veränderung der Hemmparameter.

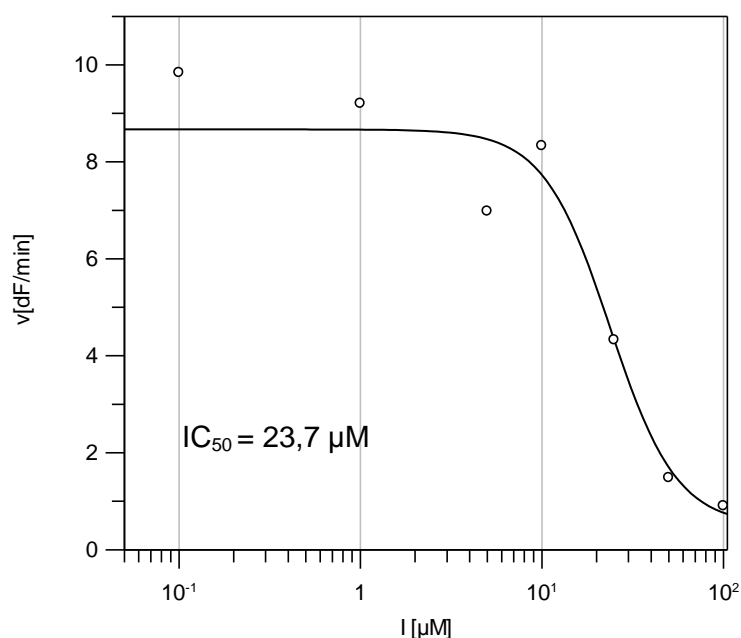


Abbildung 5.19: Bestimmung des IC_{50} -Wertes unter Verwendung eines DABCYL-EDANS-Substrates

Substanz **10** weist eine starke Gelbfärbung auf. Höher konzentrierte Inhibitorlösungen zeigten ebenfalls eine deutlich gelbe Färbung. Dies ließ die Vermutung zu, dass eine

Absorption im betrachteten Wellenlängenbereich auftritt. Bei der Aufnahme eines UV-Spektrums (siehe Abbildung 5.18) ließ sich ein Absorptionsmaximum bei ca. 320 nm feststellen. Damit liegt eine Absorption im Bereich der Anregungswellenlänge des Substrates vor. Die Korrektur des inneren Filtereffektes führte zu keiner signifikanten Änderung der Messwerte. Daher ist davon auszugehen, dass der Absorptionseffekt bei 320 nm, keinen großen Effekt auf das detektierte Signal ausübt.

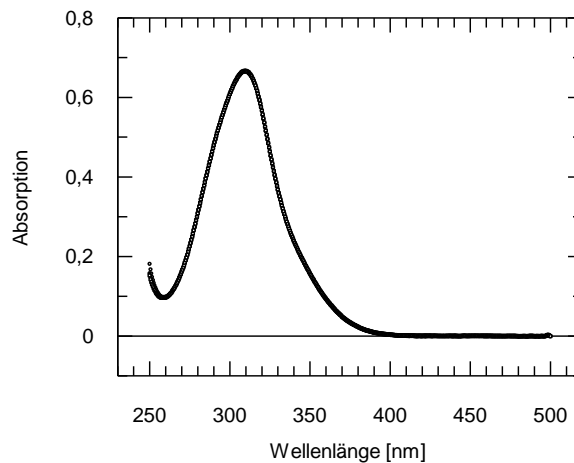


Abbildung 5.20: UV-Spektrum von Substanz 10

Interessanter war der Aspekt, dass nach Zusatz von Triton X-100 eine Minderung hinsichtlich der Hemmwirkung deutlich wurde. Die ließ auf eine Aggregation oder auch unspezifische Hemmung schließen.

Zur Verifizierung der von Shie et al. angegebenen kompetitiven Kinetik, wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik aufgenommen (Abbildung 5.21). Dabei zeigte sich jedoch statt einer kompetitiven eine nicht-kompetitive Kinetik, die weiterhin die Vermutung der Aggregation bestärkte.

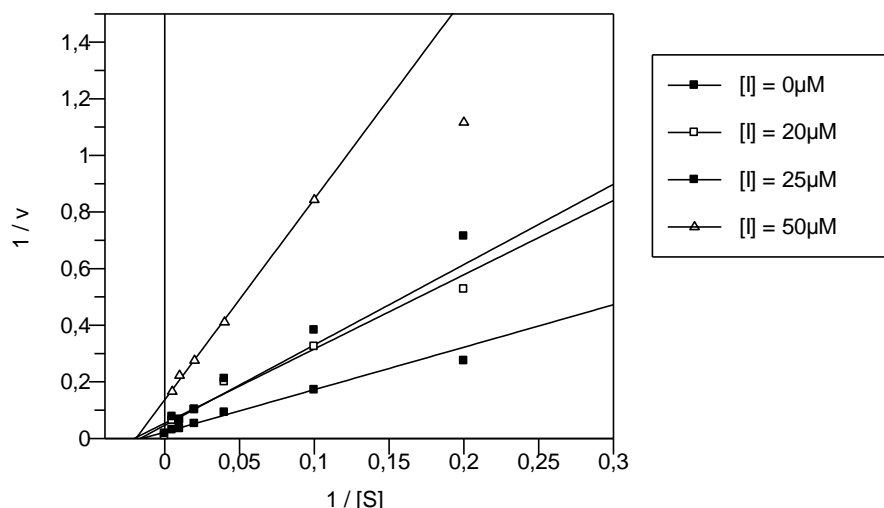
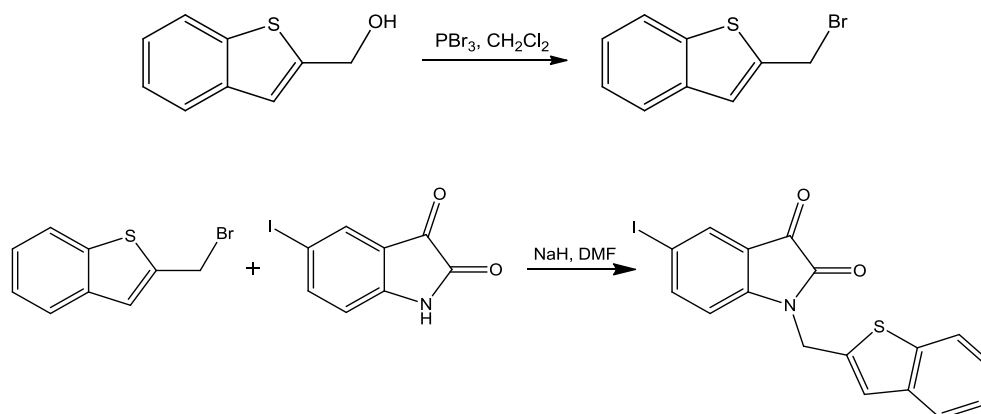


Abbildung 5.21: Lineweaver-Burk-Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik des Anilids bei Konzentrationen von 0, 20, 25 und 50 μM

5.3.5 Isatin – Synthese und zusätzliche Testungen

Aufgrund der Tatsache, dass das zu testende Iodoisatin nicht kommerziell erhältlich ist, sollte diese Substanz zunächst synthetisiert werden.

Dazu wurde die Synthese des 2-(Bromomethyl)-1-benzothiophens als Reaktionsedukt in Anlehnung an Webber et al.^[80] und anschließend die Synthese des Iodoisatins nach Chen et al.^[132] durchgeführt.



Für die Synthese des Eduktes (2-(Bromomethyl)-1-benzothiophen) wurden 0,5 g des 2-(Hydroxy)-1-benzothiophens in 10 ml Dichlormethan gelöst und bei 0°C mit 0,3 ml Phosphortribromid versetzt. Dieser Ansatz wurde zunächst 20 min bei 0°C und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Dichlormethanphase wurde nun dreimal mit demineralisiertem Wasser ausgeschüttelt und im nächsten Schritt über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtrieren dieses Ansatzes wurde die Lösung einrotiert und das

entstehende Produkt ausgewogen. Aufgrund der Instabilität des Produktes wurde sofort die zweite Reaktion angeschlossen. Dazu wurden 0,6 g 5-Iodoisatin in getrocknetem Dimethylformamid gelöst und bei 0°C mit 0,105 g Natriumhydrid eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde dieser Ansatz dem 2-(Bromomethyl)-1-benzothiophen aus der ersten Reaktion zugeführt und für einige Stunden gerührt.

Durch Zugabe von eisgekühltem demineralisiertem Wasser wurde nun das Iodoisatin ausgefällt, mit Petrolether gewaschen und anschließend im Exsikkator getrocknet.

Nach angeschlossener Analytik (siehe experimenteller Teil) wurde die Substanz hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität getestet. Der in Chen et al.^[132] angegebene IC_{50} -Wert von 0,95 μM konnte dabei mit einem gemessenen IC_{50} -Wert von 0,451 μM annähernd bestätigt werden.

Ebenso zeigte sich die reversible kovalente Kinetik als verifizierbar (Abbildungen 5.22 und 5.23).

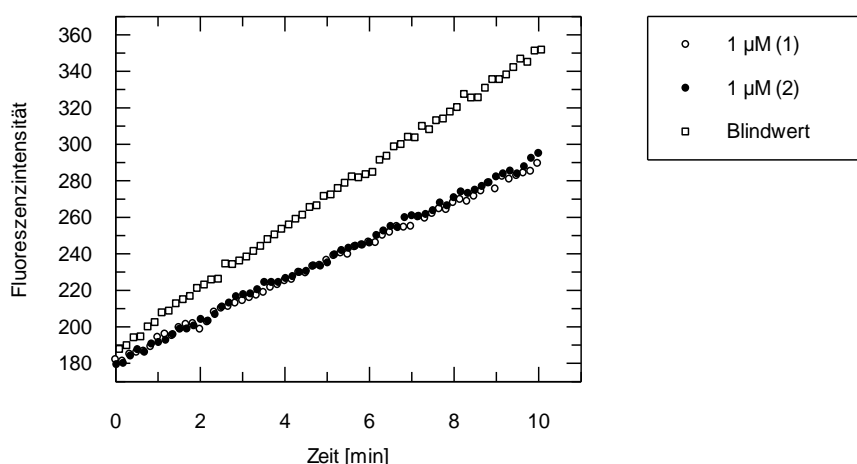


Abbildung 5.22: Bestimmung der Inhibition des Isatins nach 0 min Dialyse für Substanz 11

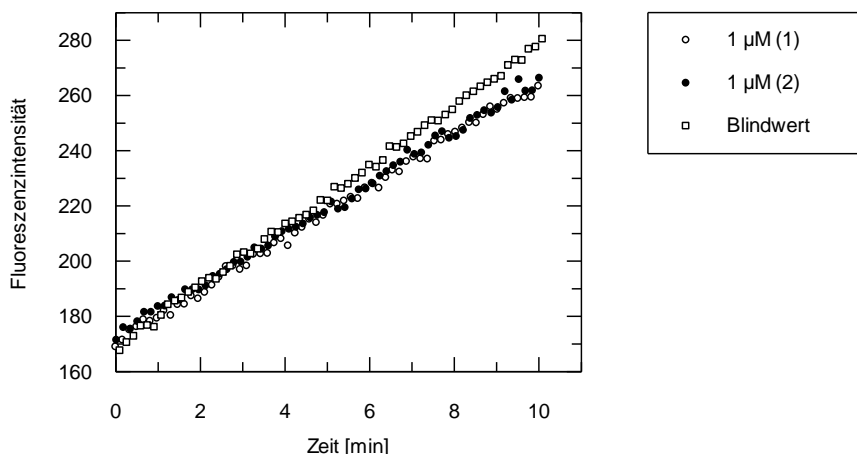


Abbildung 5.23: Bestimmung der Inhibition des Isatins nach 120 min Dialyse für Substanz 11

Bereits nach 120 Minuten lässt sich feststellen, dass die Steigung der beiden Inhibitoransätze wieder steiler wird. Dies entspricht einer gesteigerten Enzymaktivität und deutet darauf hin, dass das Isatin reversibel an der SARS-CoV M^{pro} reagiert und durch Dialyse aus dem Ansatz entfernt werden konnte. Damit ist die reversible Kinetik bestätigt.

In den Würzburger Arbeitskreisen Kisker und Schirmeister konnte eine Kristallstruktur gewonnen werden und mit Hilfe der Röntgenspektroskopie die Struktur des Komplexes aus Substanz 11 und der SARS-CoV M^{pro} aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass Substanz 11 mit dem Cystein im aktiven Zentrum eine kovalente Bindung ausbildet (Veröffentlichung in Vorbereitung). Daher wird von folgender Reaktion ausgegangen:

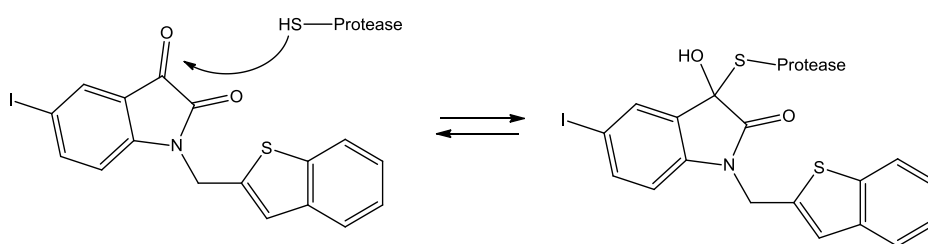
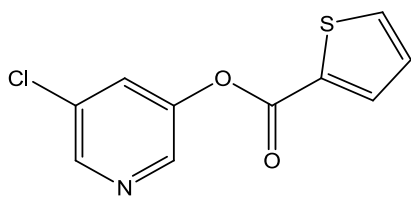


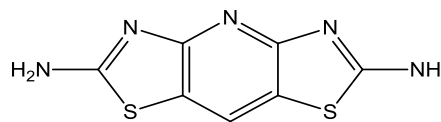
Abbildung 5.24: Reaktionsmechanismus der Umsetzung des Isatins an der SARS-CoV M^{pro}

5.4 Verifizierbare Literaturwerte

Im Rahmen der Hitvalidierung von bereits publizierten Literatursubstanzen wurden folgende zwei Substanzen aus einem Artikel von Blanchard et al.^[118] getestet:

**20**

(MAC-0005576)

**21**

(MAC-0022272)

Hierbei wurden von den Autoren, wie bereits unter 5.1 erwähnt, 50.000 Substanzen mit einer mittleren Molekularmasse von 325 g/mol in einem HTS Assay gescreent. Davon wurden nur die Inhibitoren weiter untersucht, die eine Inhibition von mindestens 50 % aufwiesen. Die Hits aus der ersten Testung wurden anschließend weiteren Testungen auf Spezifität der Inhibition unterzogen. So wurden auch hier Tests unter Zusatz von BSA durchgeführt, um unspezifische Inhibitoren herauszufiltern. Ebenso wurde DTT als alternativer Thiol donor verwendet, um unspezifische kovalente Inhibitoren zu detektieren. Bei der Messung der IC_{50} -Werte haben die Autoren nur die Substanzen weiter betrachtet, die eine typische sigmoide Kurve aufwiesen. Nach diesen Testungen verblieben Blanchard et al. nur noch fünf Substanzen.

Diese Methodik zur Validierung von Screeninghits kommt dem hier verwendeten Arbeitsablauf sehr nahe. Daher sollten aus den verbliebenen fünf Hits von Blanchard et al. auch ausgewählte Substanzen hinsichtlich ihrer Hemmwirkung verifiziert werden.

Ein von Blanchard et al. publizierter Inhibitor, Substanz **2**, wurde in Kapitel 5.2.2 bereits als Aggregator beschrieben. Hier ließ sich das Ergebnis der Autoren nicht bestätigen. Wie Tabelle 5.7 zeigt, scheint diese Substanz empfindlicher auf den Zusatz von Triton X-100 als auf die Zugabe von BSA zu reagieren. Da bei Blanchard et al. die Entscheidung darüber, ob eine Substanz aggregiert oder nicht, über die BSA-Testung getroffen wird, könnte dies die Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Tabelle 5.7: Änderung der Inhibitionswerte von Substanz 2 durch Zusatz von Triton X-100 sowie BSA¹⁾

Substanz	% Inhibition bei [I] = 100 μ M	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von BSA (0,1%)
2	80,8 \pm 5,23	6,85 \pm 1,34	52,4 \pm 2,62 ²⁾

¹⁾ zur deutlicheren Darstellung: Mittelwerte aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang

²⁾ dieses Ergebnis wurde bei der Testung unter Zusatz von BSA innerhalb des Assay-Arbeitsablaufs erhalten

Substanz **20** wird bei Blanchard et al. mit einem IC₅₀-Wert von 0,5 \pm 0,3 μ M angegeben. Außerdem wird beschrieben, dass diese Substanz eine Selektivität für Proteasen mit einer Chymotrypsin-ähnlichen Faltung aufweist.

Substanz **21** wird von den Autoren mit einem IC₅₀-Wert von 2,6 \pm 0,4 μ M und einer geringen Selektivität angegeben.

Wie Tabelle 5.8 zeigt, konnten die IC₅₀-Werte im Standardassay verifiziert werden. Auch bestätigte sich die Selektivität der Substanz **20**, da im Cathepsin B-Assay keine gute Hemmwirkung zu verzeichnen war.

Tabelle 5.8: Bestimmung der Selektivität von Substanz 20 und 21

Substanz	IC ₅₀ -Werte [μ M]	% Inhibition bei [I] = 100 μ M im SARS- CoV M ^{pro} -Assay	% Inhibition bei [I] = 100 μ M im Cathepsin B-Assay
20	0,106 \pm 0,008	99,2 \pm 0,282	3,00 \pm 0,819
21	4,08 \pm 0,240	99,5 \pm 0,282	Außerhalb des Fluoreszenzbereichs

¹⁾ zur deutlicheren Darstellung: Mittelwerte aus mindestens zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang

Beide Inhibitoren zeigten keine Änderungen in ihrer Hemmwirkung nach Einbeziehen des Korrekturfaktors f_{corr} , so konnte eine mögliche Absorption bei der Detektionswellenlänge ausgeschlossen werden. Ebenso zeigte sich kein Effekt unter Zusatz von Triton X-100.

Anders als bei Substanz **20** konnte bei Substanz **21** eine Minderung der Hemmwirkung unter Zusatz von DTT (700 μ M) festgestellt werden (von 99,5 % Inhibition zu 58,9 % Inhibition unter Zusatz von DTT).

5.5 Diskussion der Ergebnisse

Die Hitvalidierung der bereits publizierten Inhibitoren anhand des erarbeiteten Arbeitsablaufs hat gezeigt, dass die meisten der getesteten Strukturen nicht die publizierten Eigenschaften und Hemmwirkungen besitzen. Somit konnten diese Substanzen nicht als Grundlage für weitere Testungen verwendet werden. Demgegenüber konnten einige der publizierten Ergebnisse (Substanz **11**, **20** und **21**) verifiziert werden. Bei Substanz **20** und **21** handelt es sich um Strukturen aus einer Publikation von Blanchard et al.^[118] Allgemein zeigte sich, dass sich die Werte von Blanchard et al. im Vergleich zu den anderen getesteten Literatursubstanzen recht gut bestätigen ließen. Dies lässt sich darauf zurückschließen, dass sich die Autoren hier der Möglichkeit eines falsch positiven Hits bewusst waren und mit zusätzlichen Testungen unter Zusatz von DTT und BSA nach guten Ergebnissen im ersten Screening, gezielt auf unspezifische Hemmungen geprüft haben.

Die Hemmwirkungen der übrigen Literatursubstanzen konnte nach Anwenden des Assay-Arbeitsablaufs aus verschiedenen Gründen nicht bestätigt werden:

Substanz **1** wies mit einem IC_{50} -Wert von 5,30 μM (unkorrigierter Wert) unter den vorliegenden Bedingungen bereits ein Vielfaches des von Lu et al.^[117] publizierten Wertes von 0,3 μM auf. Zudem zeigte sich nach Zusatz von DTT im Assayansatz, dass die Substanz unspezifisch kovalente Bindungen eingeht. Auch dieser Aspekt steht im Widerspruch zu den Angaben von Lu et al., da die Autoren explizit von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Substanz **1** und der Bindetasche der SARS-CoV M^{pro} sprechen. Des Weiteren ließ sich die von den Autoren pubizierte Kristallstruktur nicht bestätigen, da aus einer Reihe von zusätzlichen Testungen (HPLC, Massenspektrometrie, NMR) hervorging, dass Substanz **1** nicht als intaktes Molekül mit der Bindetasche interagiert, sondern ein Teil der Struktur eine kovalente Bindung zum aktiven Zentrum ausbildet. Lu et al. scheinen die Substanz nicht zusätzlich auf eine mögliche kovalente Bindung untersucht zu haben. Bei Blanchard et al.^[118] fällt dieselbe Substanz im zweiten Screening durch. Hier werden unter anderem auch Testungen unter Zusatz von DTT durchgeführt. Zwar geben die Autoren keinen expliziten Grund für das Herausfallen der Substanz aus der Hitliste an, jedoch scheint es nach den hier vorliegenden Ergebnissen als wahrscheinlich, dass die mögliche unspezifisch-kovalente Bindung der Grund dafür gewesen ist.

Die Substanzen **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **8** und **10** erwiesen sich unter den gegebenen Bedingungen als falsch positive Inhibitoren durch Aggregation.

Bei diesen sieben Substanzen konnten die publizierten Werte bereits mit den hier ermittelten unkorrigierten IC_{50} -Werten in den meisten Fällen nicht erreicht werden (Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9: Vergleich der Literaturwerte mit den gemessenen IC₅₀-Werten

Inhibitor	publizierte Werte	gemessener IC ₅₀ -Wert [μ M]
2	IC ₅₀ = $7 \pm 3 \mu\text{M}$	$53,4 \pm 13,1$
3	IC ₅₀ = $3 \mu\text{M}$	$16,5 \pm 0,4$
4	K _i = $11 \pm 2 \mu\text{M}$	$49,5 \pm 1,1$
6	IC ₅₀ = $18,2 \mu\text{M}$	$132,9 \pm 2,4$
7	IC ₅₀ = $17,2 \mu\text{M}$	$39,1 \pm 2,1$
8	K _i = $61 \pm 6 \mu\text{M}$ Inhibition bei $40 \mu\text{M}$ = 43 %	$17,4 \pm 0,9$
10	IC ₅₀ = $0,06 \mu\text{M}$	$35,0 \pm 7,0$

Der IC₅₀-Wert ist sehr stark von den Versuchsbedingungen abhängig. Da sich diese in den Publikationen teilweise sehr stark von den hier verwendeten Bedingungen unterscheiden, kommen die großen Diskrepanzen zwischen in den publizierten Werten und den hier gemessenen Werten zustande.

Durch Gegenüberstellen der Werte zum einen ohne Detergenzienzusatz und zum anderen nach Zusatz von Triton X-100 (0,01%), erwies sich der IC₅₀-Wert jedoch als geeignete Vergleichsgröße zur Detektion von Aggregaten. Wie die Ergebnisse in Tabelle 5.3 zeigen, steigt der IC₅₀-Wert bei den Substanzen **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **8** und **10** nach Zusatz von Triton X-100 deutlich an. Ebenso ließ sich über DLS-Messungen in allen Fällen Partikelgrößen um $1 \mu\text{M}$ detektieren. Bei der Aggregation handelt es sich um einen Effekt, der zu unspezifischer Hemmung von Enzymen führt. Zu den Substanzen **3**, **6**, **7** und **8** werden von den Autoren keine Aussagen zur Selektivität oder zusätzlichen Testungen getroffen.

Interessanterweise wird jedoch Substanz **2** von Blanchard et al.^[118] als selektiver Inhibitor beschrieben, der keinerlei Hemmwirkung auf Chymotrypsin und Papain besitzt. Möglicherweise, wurde der Effekt der Aggregation in den Assaybedingungen des Chymotrypsin- bzw. Papain-Assays nicht deutlich. Zum anderen verwenden die Autoren zur Detektion unspezifischer Bindungen einen Zusatz von BSA. Wie unter Kapitel 5.4 gezeigt werden konnte, reagiert Substanz **2** scheinbar deutlicher auf den Zusatz von Triton X-100, da die Inhibition unter Zusatz von BSA nicht so stark sinkt wie unter Zusatz von Triton X-100. Kao et al.^[120] vermuteten unter einigen ihrer getesteten Substanzen falsch positive Effekte durch Lichtstreuung oder auch Absorption, die sie durch das Verwenden eines HPLC-Assays vermeiden wollten. Substanz **4** verblieb demnach als richtig positive Substanz. Zu weiteren Selektivitätstestungen an weiteren Cysteinproteasen gibt es keine Angaben.

Shie et al. geben Substanz **10** als selektiven Inhibitor an, der keine Hemmwirkung auf Chymotrypsin und Papain besitzt. Möglicherweise ist auch hier der Grund in den Assaybedingungen des Chymotrypsin- bzw. Papain-Assays zu suchen.

Substanz **5** wurde ebenso wie Substanz **4** von Kao et al.^[120, 121] als richtig positiver Inhibitor angegeben. Mit einem IC_{50} -Wert von 17,9 μM (unkorrigierter Wert) zeigt diese Substanz jedoch nicht die publizierte Hemmstärke ($IC_{50}=2,5 \mu M$). Dies könnte wiederum an leicht unterschiedlichen Assaybedingungen liegen. Nach Zusatz von DTT (700 μM) sank die Inhibition unter den hier verwendeten Assaybedingungen von 32,5 auf 11,6 %. Dies spricht für einen potenziell kovalenten Inhibitor. Dieser Aspekt sollte jedoch über Testungen an weiteren Cysteinproteasen untersucht werden (Kapitel 6.5).

Substanz **9** wurde von Liu et al.^[127] als zeitabhängiger, kompetitiver Inhibitor der SARS-CoV M^{pro} beschrieben. Beide Aspekte konnten unter den vorliegenden Bedingungen, sowie nach Angleichen der Bedingungen an die betreffende Publikation, nicht verifiziert werden. Da Hexachlorophen eine schlechte Löslichkeit im Wässrigen aufweist, ist möglicherweise hier der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zu suchen.

Substanz **11** konnte nach den Vorgaben von Webber et al.^[80] bzw. Chen et al.^[132] synthetisiert werden und erwies sich als reversibler kovalenter Inhibitor. Während Webber et al. die Isatine als reaktive und reversible Inhibitoren charakterisieren, wird bei Chen et al. sowie Zhou et al. nicht von einer kovalenten Bindung gesprochen. Zhou et al.^[133] geben zwar an, dass unter Zusatz von DTT die Inhibition der Isatine an der SARS-CoV M^{pro} sinkt, gleichwohl geben die Autoren die Isatine als reversible und nichtkovalente Inhibitoren an. Diese Aussage steht so scheinbar im Widerspruch zu den Testergebnissen der Autoren. Die Testergebnisse decken sich jedoch mit den Ergebnissen unter Anwenden des Assay-Arbeitsablaufs. Ebenso konnte mit einem IC_{50} -Wert von 0,451 μM annähernd der Literaturwert von 0,95 μM bestätigt werden.

Beim Cinanserin, Substanz **12**, konnte der IC_{50} -Wert von 5 μM nach Chen et al.^[82] nicht verifiziert werden. Dagegen konnte nur ansatzweise mit einem IC_{50} -Wert von 459 μM der deutlich schlechtere Inhibitionswert aus der jüngeren Veröffentlichung der Autoren^[134] ($IC_{50} = 323 \mu M$) bestätigt werden. Damit erwies sich diese Substanz als nicht geeignet für die weitere Betrachtung.

Eine Erklärung für die vielen publizierten falsch positiven Inhibitoren könnte sein, dass in den meisten Publikationen auf Testungen auf Artefakte verzichtet wurde. Dies könnte zum einen

darin liegen, dass hier die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Inhibitors unterschätzt worden sind. Eine weit plausiblere Erklärung liegt jedoch in der Tatsache, dass zum Ausbruch der SARS die Zeit drängte, geeignete Wirkstoffe gegen diese neuartige Krankheit zu finden. So bestand ein hoher Druck schnell Ergebnisse zu publizieren. Aufgrund des Zeitdrucks kann es somit dazu gekommen sein, dass so viele der publizierten Daten fehlerbehaftet sind.

Die Ergebnisse der Hitvalidierung demonstrieren wie essentiell ein valider Enzymassay im Rahmen der Leitstruktursuche ist. Erst nach Prüfen eines Inhibitors auf mögliche falsch positive Effekte und nach genauer Kenntnis der Kinetik kann dieser als Basis für die weitere Wirkstoffsuche dienen.

6 Selektivitätstestungen an unterschiedlichen Cysteinproteasen

Zusätzlich zu der Testung am betrachteten Target ist es darüber hinaus wichtig, die Selektivität von Inhibitoren zu prüfen. Dies wird durch Bestimmung der Inhibition an möglichst verschiedenen Enzymen erreicht.

Obwohl die Hitvalidierung nicht die gewünschte Leitstruktur für die weitere Suche erbracht hat, sollten ausgewählte Substanzen ebenfalls einer Testung auf Selektivität unterzogen werden. Im Fokus stand dabei die Betrachtung von Aggregatoren und kovalenten Inhibitoren. Somit sollte geprüft werden, ob sich die jeweiligen Hemmmechanismen bzw. falsch positiven Ergebnisse auch an anderen Enzymen bestätigen lassen. Dabei sollte die Betrachtung im Bereich der Cysteinproteasen verbleiben. Dennoch sollten aus dieser Enzymklasse möglichst diverse Proteasen gewählt werden.

6.1 Auswahl der Cysteinproteasen

Bei der Auswahl der Cysteinproteasen sollte vor allem darauf geachtet werden, dass es sich um möglichst unterschiedliche Cysteinproteasen handelt. Wie in Kapitel 1 bereits angesprochen, sind Unterschiede in Aufbau und Struktur der Cysteinproteasen immer dann gegeben, wenn es sich um Proteasen aus möglichst unterschiedlichen Familien aus unterschiedlichen Clans handelt. Zunächst wurde geprüft, welche Cysteinproteasen kommerziell erhältlich sind. Im zweiten Schritt wurde geprüft, aus welchen Familien diese stammen. Die folgenden Cysteinproteasen wurden dabei untersucht: Cathepsin B, L, K und S, Caspase-1,-3,-7 und-9 sowie Calpain-1, Calpain-2 und Clostripain.

Dabei stammen die betrachteten Cathepsine aus Familie C1 des CA-Clans, die Calpaine aus Familie C2 des CA-Clans, das Clostripain aus Familie C11 des CD-Clans und die Caspasen aus Familie C14 des CD-Clans. Um zu prüfen, inwieweit eine hinreichende Diversität gegeben ist, wurden zunächst im ersten Schritt die Schnittsequenzen dieser Proteasen verglichen.^[4] Hier zeigten sich aufgrund der favorisierten Aminosäuren in Bindungstasche S₁ und zum Teil auch S₂ schon hinreichende Unterschiede von Proteasen unterschiedlicher Familienherkunft.

Die Cathepsine K, L und S zeigten sehr große Ähnlichkeit. Selbiges gilt für die Calpain-1 und Calpain-2 (siehe MEROPS-Datenbank^[4]).

Für einen deutlichen Vergleich wurden im zweiten Schritt Kristallstrukturen der zu untersuchenden Proteasen in der pdb-Datenbank herausgesucht. Im Falle eines Dimers (oder Oligomers) wurde jeweils eine repräsentative Kette gewählt, sowie Liganden und Wassermoleküle entfernt.

Auf dieser Grundlage wurde von Jan Dreher (Arbeitskreis Baumann) mit Hilfe der Alignmentfunktion des Homologie-Modules der Software MOE (Version 2010.10)® (Chemical Computing Group) ein sogenanntes strukturbasiertes Sequenzalignment der Kristallstrukturen durchgeführt.

Basierend auf dem Sequenzalignment wurden anschließend die Kristallstrukturen übereinander gelegt, indem der RMSD der C α -Atomen der alignierten Aminosäuren minimiert wurde. In Abbildung 6.1 sind diese RMSD-Werte angegeben. In Tabelle 6.1 sind die pdb-IDs der betrachteten Cysteinproteasen gelistet, sowie die Angabe zu den aktiven Zentren der jeweiligen Proteasen.

RMSD - 16.174 Å												
	1	3	5	8	9	12	14	16	17	19	21	
1: 1BMQ.A	0.00	6.73	6.74	18.7	16.1	7.85	16.2	20.2	18.4	16.2	18.2	4.0
3: 1CP3.A	6.73	0.00	0.51	18.7	16.0	8.73	16.0	19.5	18.2	16.1	19.9	3.5
5: 1F1J.A	6.74	0.51	0.00	18.7	15.9	8.73	16.0	19.4	18.2	16.0	19.8	3.0
8: 1KFX.L	18.7	18.7	18.7	0.00	16.7	17.9	16.7	20.2	2.52	16.7	17.1	2.5
9: 1MHW.A	16.1	16.0	15.9	16.7	0.00	14.6	0.61	19.3	16.7	0.65	16.6	2.0
12: 1NW9.A	7.85	8.73	8.73	17.9	14.6	0.00	14.6	19.1	17.7	14.7	18.7	1.5
14: 1TU6.A	16.2	16.0	16.0	16.7	0.61	14.6	0.00	19.4	16.8	0.53	16.7	1.0
16: 1UJ1.A	20.2	19.5	19.4	20.2	19.3	19.1	19.4	0.00	20.0	19.5	18.3	0.5
17: 1ZCM.A	18.4	18.2	18.2	2.52	16.7	17.7	16.8	20.0	0.00	16.8	17.0	0.0
19: 2FRQ.A	16.2	16.1	16.0	16.7	0.65	14.7	0.53	19.5	16.8	0.00	16.7	
21: 2IPP.A	18.2	19.9	19.8	17.1	16.6	18.7	16.7	18.3	17.0	16.7	0.00	

Abbildung 6.1: RMSD-Werte des Sequenzalignments der ausgewählten Cysteinproteasen

Tabelle 6.1: Gewählte Cysteinproteasen und ihre pdb-ID sowie Angabe des aktiven Zentrums

Cysteinprotease	pdb-ID	aktives Zentrum
Cathepsin B	2IPP	Cys29, His199, Asn 219
Cathepsin L	1MHW	Cys156, His140, Asn137
Cathepsin K	1TU6	Cys139, His276, Asn296
Cathepsin S	2FRQ	Cys25, His164, Asn184
Calpain-1	1ZCM	Cys115, His272, Asn296
Calpain-2	1KFX	Cys105, His262, Asn286
Caspase-1	1BMQ	His237, Cys285
Caspase-3	1CP3	His121, Cys163
Caspase-7	1F1J	His144, Cys186
Caspase-9	1NW9	His237, Cys287
SARS CoV M ^{pro}	1UJ1	Cys145, His163, Glu166

In der Analyse zeigte sich auch hierbei deutlich, dass die Proteasen mit ähnlicher Abstammung wie zum Beispiel die Cathepsine L, K und S kaum Unterschiede aufweisen. Calpain-1 und Calpain-2 unterscheiden sich ebenfalls kaum.

Auf Basis der RMSD-Werte des strukturbasierten Alignments wurden von strukturell unterschiedlichen Cysteinproteasen neben dem bereits verwendeten Cathepsin B drei weitere Proteasen zur Entwicklung der Assays ausgewählt: Clostripain, Calpain-1 und die Caspase-1. Caspase-1 und Calpain-1 zeigten mit hohen RMSD-Werten hinreichende Diversität zueinander. Zeigten einige Proteasen zueinander eine hohe Ähnlichkeit und somit einen niedrigen RMSD-Wert, jedoch zu den weiteren Proteasen einen hohen RMSD-Wert, so wurde eine der Proteasen ausgewählt (wie im Falle von Calpain-1 und -2). Die Cathepsine L, K und S zeigten zueinander hohe Ähnlichkeit, zu den anderen Cysteinproteasen bestand jedoch jeweils ein hoher RMSD-Wert. Das bedeutet, dass aus dieser Gruppe auch ein Vertreter als Testenzym für die Selektivitätstestungen denkbar gewesen wäre. Nach ersten Testungen mit Cathepsin L wurde die Entwicklung des Assayprotokolls für diese Cysteinprotease nicht weiter verfolgt. Für das Clostripain ist keine Kristallstruktur verfügbar gewesen. Aufgrund der Tatsache, dass es einer anderen Familie als die übrigen betrachteten Cysteinproteasen angehört, wurde es als weitere Protease für die Selektivitätsmessungen ausgewählt.

Im Folgenden sollen die gewählten Proteasen zunächst charakterisiert werden und anschließend die Entwicklung der jeweiligen Assays erläutert werden.

6.2 Clostripain

Die Cysteinprotease Clostripain (EC 3.4.22.8) wird aus dem Filtrat einer Kultur des anaeroben Bakteriums *Clostridium histolyticum* isoliert. Diese Isolierung wurde als erstes von Kocholaty et al.^[136] durchgeführt. Hier wird zunächst nur von einer Protease gesprochen, die durch Substanzen mit einer Thiofunktion aktiviert wird und bevorzugt Clupein und nicht Gelatin hydrolysiert. Die Bezeichnung Clostripain erhielt diese Cysteinprotease erst später durch Labouesse und Gros (1960).^[10]

Bei Clostripain handelt es sich um ein Heterodimer, bestehend aus einer Untereinheit mit 43000 Dalton und einer weiteren mit 15398 Dalton.^[10]

Clostripain besitzt Esterase-, Amidase- und Proteaseaktivität, zeigt eine hohe Spezifität für die Hydrolyse von Arg-Xaa Bindungen und schneidet auch Substrate, die in P'₁ Position Prolin aufweisen.^[137, 138, 139]

Diese Spezifität wird unter anderem für Sequenzanalysen genutzt.^[139]

6.2.1 Inhibitoren des Clostripains

In der Literatur lassen sich nur wenige Inhibitoren des Clostripains finden. Hauptsächlich wurden zunächst Inhibitoren von Trypsin-ähnlichen Proteasen getestet, wie das Benzamidin. Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist das α -N-Tosyllysinchloromethylketon (TLCK) (Abb.2.7). Dieses bietet mit dem Chloromethylketonrest die Möglichkeit einer irreversiblen Inhibition.

Nach Gusman et al.^[140] wird Histatin 5 als kompetitiver Inhibitor des Clostripains mit einem K_i-Wert von 10 nM angegeben. Bei Histatin 5 handelt es sich um ein niedermolekulares Protein des Speichels.

Kleine nichtpeptidische Moleküle für die Testung an Clostripain werden in der Weise gewählt, die Argininspezifität des Clostripains zu nutzen, um so eine hohe Affinität des Inhibitors zur Protease zu erhalten.

6.2.2 Entwicklung eines fluorimetrischen Enzymassays für Clostripain

Die Hydrolyse des Benzoylargininethylesters durch Clostripain wird als Standardassay zur Messung der Aktivität verwendet.^[138, 141] Dabei wird der Benzoylargininethylester unter Einfluss des Clostripains in Ethanol und Benzoylarginin gespalten. Die Hydrolyse des Benzoylargininethylesters wird bei einer Wellenlänge von 253 nm detektiert.

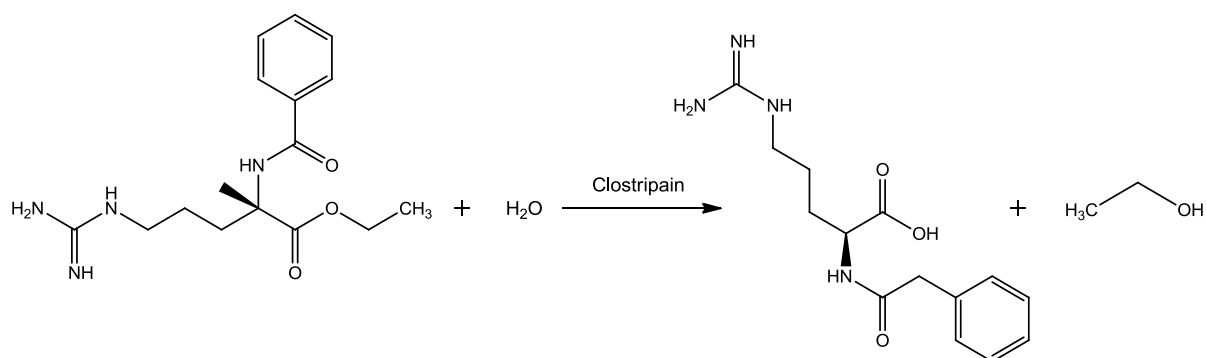


Abbildung 6.2: Hydrolyse des Benzoylargininethylesters

Im Folgenden sollte ein fluorimetrischer Enzymassay entwickelt werden. Dazu wurden zwei Publikationen als Grundlage herangezogen, Kembhavi et al.^[142] sowie Schirmeister et al.^[143]. Nach Kembhavi et al.^[142] wird die Enzymlösung zunächst mit 8 mM DTT für 20 min bei 0°C aktiviert. Als Pufferlösung wird folgende Zusammensetzung verwendet: 20 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl₂, 0,005% Brij 35, 2 mM DTT, pH 7,5. Durch Hydrolyse des Substrates Z-Phe-Arg-AMC wird die Aktivität des Enzyms fluorimetrisch bestimmt.

Nach Schirmeister et al.^[143] wird folgendes Assayprotokoll verwendet. Die Konzentration des Clostripains beträgt 3,0 bis 5,9 mg/ml. Als Pufferlösung wird ein Phosphatpuffer pH 7,6 unter Zusatz von 200 mM NaCl und 2,5 mM DTT verwendet. Auch hier dient Z-Phe-Arg-AMC als Substrat und wird in Konzentrationen zwischen 0,011 und 0,094 mM verwendet. Der K_m-Wert wird mit 0,023 mM angegeben.

Zunächst ergab sich die Fragestellung, wie das von Sigma-Aldrich bezogene Lyophilisat zu lösen sei, ohne die Aktivität zu schwächen, da eine bereits mit DTT aktivierte Enzymlösung auch bei einer Lagerung bei -20°C mit der Zeit an Aktivität verliert.

Daher sollte das Lyophilisat zunächst in einem 20 mM Tris-Puffer wie bei Kembhavi et al. gelöst werden, allerdings nur unter Zusatz von CaCl₂, das zur Stabilisierung des Enzyms beiträgt.

Diese hergestellte Enzymlösung wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kurz vor Beginn der Messungen wurde dann ein Aliquot des Clostripains aufgetaut und mit Tris-Puffer unter Zusatz von 2 mM DTT für 20 min auf Eis aktiviert.

Bei den ersten Testungen des Clostripains wurden dem Assaypuffer 0,005% Brij 35 zugesetzt, wie bei Kembhavi et al. Dieses nichtionische Detergenz verbessert die Löslichkeit der DMSO-haltigen Substratlösung im wässrigen Assaymedium. Es wird dadurch auch eine stärkere Aktivität des Enzyms gemessen. Zunächst sollte geprüft werden, in welchem Ausmaß das nichtionische Detergenz Brij 35 in einer Konzentration von 0,005% zu einer höheren Enzymaktivität beiträgt. Es zeigte sich, dass der DMSO-Anteil des Assayansatzes

die Größe der Aktivitätsunterschiede zwischen Ansätzen ohne und mit Brij 35-Zusatz beeinflusst (Abbildung 6.3 und 6.4).

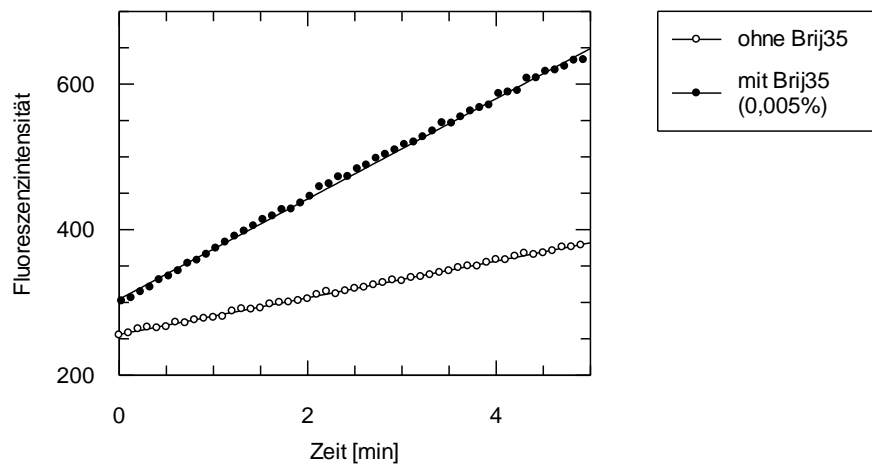


Abbildung 6.3: Messung der Enzymaktivität bei einem DMSO-Anteil von 4% mit und ohne Zusatz von Brij35 (0,005%)

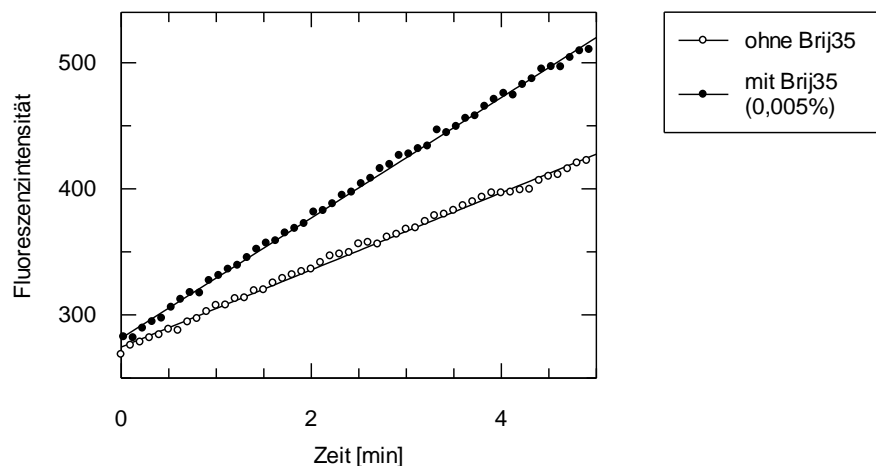


Abbildung 6.4: Messung der Enzymaktivität bei einem DMSO-Anteil von 12% mit und ohne Zusatz von Brij35 (0,005%)

Um zu untersuchen, welchen Einfluss allein die DMSO-Konzentration im Assayansatz auf die Aktivität des Clostripains besitzt, wurden Testungen mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen (4-12%) ohne Brij-Zusatz durchgeführt (siehe experimenteller Teil). Als Vorteil einer hohen DMSO-Konzentration, bezogen auf den Assayansatz, wird angesehen, dass hierbei die Anfangskonzentrationen der Inhibitorlösungen niedriger gewählt werden können. Dieser Zusammenhang ergibt sich daraus, dass der DMSO-Anteil des Assayansatzes hauptsächlich über die Inhibitorlösung eingebracht wird. Bei hohen DMSO-Konzentrationen kann somit das Volumen der zuzugebenden Inhibitorlösung größer gewählt werden. Da die betrachtete Inhibitorkonzentration jedoch gleich bleiben soll, resultiert daraus

die Herstellung einer Inhibitorlösung von niedrigerer Ausgangskonzentration. So kann die Gefahr des Auskristallisierens bzw. der schlechten Löslichkeit umgangen werden. Allerdings mindert ein hoher DMSO-Anteil die Enzymaktivität. Um diesen Aspekt zu prüfen, wurden verschiedene DMSO-Anteile im Assay getestet (Abbildung 6.5).

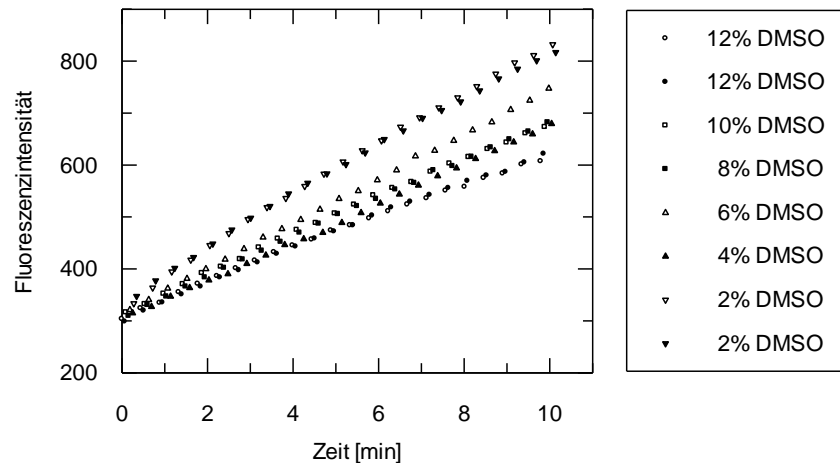


Abbildung 6.5: Umsatz-Zeit-Diagramm der Messung der Clostripainaktivitäten bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen, kein Zusatz von Brij 35

Die Messungen bestätigen, dass ein höherer DMSO-Gehalt im Assayansatz eine geminderte Enzymaktivität bedingt. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob sich diese geminderte Aktivität bei Testungen auf die Inhibitionswerte auswirkt.

Dazu wurde der bereits bekannte irreversible Cysteinproteaseinhibitor E-64 als Beispiel verwendet. Dieser Inhibitor wurde in drei Konzentrationen getestet: 0,2, 2 und 20 μM . Bei den Testungen wurden gleichzeitig zwei Blindwerte gemessen.

Zum einen wurde der Assay bei einer DMSO-Konzentration von 4% zum anderen von 12% durchgeführt. Dabei wurde auch bei diesen Messungen auf einen Zusatz von Brij 35 verzichtet. Anhand der Ergebnisse lässt sich erkennen, dass sich die Inhibition [%] bei den unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen nicht ändert. Das bedeutet, dass bei gleichen Versuchsbedingungen für den Blindwert und den Messwert anscheinend keine Störungen durch eine Teilinhibition des Enzyms durch einen erhöhten DMSO-Anteil zu erwarten sind.

Tabelle 6.2: Messung von verschiedenen E-64-Konzentrationen bei einem DMSO-Anteil von 4%¹⁾

Inhibitorkonzentration (E-64) [μ M]	Prozent Inhibition [%]
0,2	2,35 \pm 3,32
2	15,9 \pm 6,36
20	64,9 \pm 2,19

¹⁾zur deutlicheren Darstellung: Mittelwert aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang

Tabelle 6.3: Messung von verschiedenen E-64-Konzentrationen bei einem DMSO-Anteil von 12%¹⁾

Inhibitorkonzentration (E-64) [μ M]	Prozent Inhibition [%]
0,2	5,10 \pm 7,21
2	19,3 \pm 1,56
20	64,9 \pm 0,212

¹⁾zur deutlicheren Darstellung: Mittelwert aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte), Einzelwerte siehe Anhang

Nach den Erfahrungen der vorherigen Testungen, die eine Vielzahl von aggregatbildenden Substanzen aufwiesen, stellte sich die Frage, inwieweit ein veränderter DMSO-Anteil die Aggregation beeinflusst. Gleichzeitig sollte überprüft werden, welchen Einfluss eine Zugabe von Brij 35 in einer Konzentration von 0,005% auf die Inhibitionswerte hat. Alle Protease-Assays wurden bislang zunächst ohne Zusatz eines solchen Detergenz durchgeführt, um aggregatbildende Inhibitoren zu detektieren. Eine anschließende Testung mit Zusatz von Triton X-100 als nichtionischem Detergenz diente dann dazu, eine merkliche Senkung des Inhibitionswertes zu verdeutlichen. Da das erarbeitete Assayprotokoll ebenfalls auf die neuerworbenen Cysteinproteasen angewendet werden sollte, erschien es sinnvoll gleiche Bedingungen zu verwenden. Inwieweit die DMSO-Konzentration und ein Zusatz von Brij 35 einen Einfluss haben, sollte mittels bereits bekannter Aggregatoren, wie Miconazolnitrat und der bereits in der Hitvalidierung getesteten Substanz **7** untersucht werden. Die Inhibitorkonzentration betrug dabei 20 μ M, als DMSO-Konzentrationen wurden wiederum 4 und 12% gewählt.

Tabelle 6.4: Prozent Inhibition bei einer InhibitorKonzentration von 20 μM ¹⁾

Inhibitor	ohne Brij35, 12% DMSO	ohne Brij35, 4% DMSO	0,005% Brij35, 12% DMSO	0,005% Brij35, 4% DMSO
Miconazolnitrat	28,5 \pm 6,35	95,6 \pm 1,04	keine Inhibition	1,57 \pm 1,40
Substanz 7	15,4 \pm 10,3	93,6 \pm 0,71	2,41 \pm 2,96	0,91 \pm 1,34

¹⁾Mittelwert aus vier Messungen mit der dazugehörigen Standardabweichung (= Standardabweichung der Einzelwerte), Tabelle der Einzelwerte im Anhang

Tabelle 6.4 zeigt, dass bei niedrigeren DMSO-Konzentrationen (hier: 4%) die aggregatbildende Eigenschaft stärker zum Ausdruck kommt, als bei höheren DMSO-Konzentrationen. Das könnte daran liegen, dass wie bereits erwähnt für einen niedrigeren DMSO-Gehalt und dementsprechend ein kleineres Volumen an Inhibitorlösung im Assayansatz, höherkonzentrierte Inhibitorstammlösungen hergestellt werden müssen, um auf die gewünschte Endkonzentration an Inhibitor zu kommen. Dadurch wird eine schlechte Löslichkeit bei der Verdünnung der Inhibitorlösung im Assaymedium noch stärker deutlich.

Ein Zusatz des nichtionischen Detergenz Brij 35 zeigt eine deutliche Minderung der Inhibitionswerte auch schon bei einer Konzentration von 0,005%.

Nach diesen Testungen erschien es zunächst aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der Bedingungen auch in Bezug auf die weiteren Cysteinprotease-Assays zunächst sinnvoll, einen DMSO-Gehalt von 12% zu verwenden und das nichtionische Detergenz zunächst herauszulassen.

Damit ergab sich für das Clostripain folgendes vorläufiges Assayprotokoll:

9 μl Aliquot (Enzymlösung) wurden mit 20 mM Tris-Puffer pH 7,5 unter Zusatz von 10 mM CaCl_2 und 2 mM DTT zu 1500 μl verdünnt. Die DTT-Pufferlösung ist dabei immer frisch herzustellen, um eine gute Reduktionsleistung zu gewährleisten. 205 μl 20 mM Tris-Puffer pH 7,5 (Zusatz von 10 mM CaCl_2), 15 μl Enzymlösung, 25 μl Inhibitorlösung und 5 μl Substratlösung wurden je „Well“ versetzt und die Aktivität über einen Zeitraum von 10 min gemessen.

Als Substrat wurde Z-Phe-Arg-AMC in einer Endkonzentration von 12 μM verwendet. Die Anregungswellenlänge lag, wie bei AMC-Substraten üblich, bei 380 nm und die Detektionswellenlänge bei 460 nm.

6.2.3 Testungen an Clostripain

Mit diesen Einstellungen sollten weitere Testmessungen zum Clostripain durchgeführt werden. So wurde zunächst der K_m -Wert des Substrates bestimmt (siehe Abbildung 6.6):

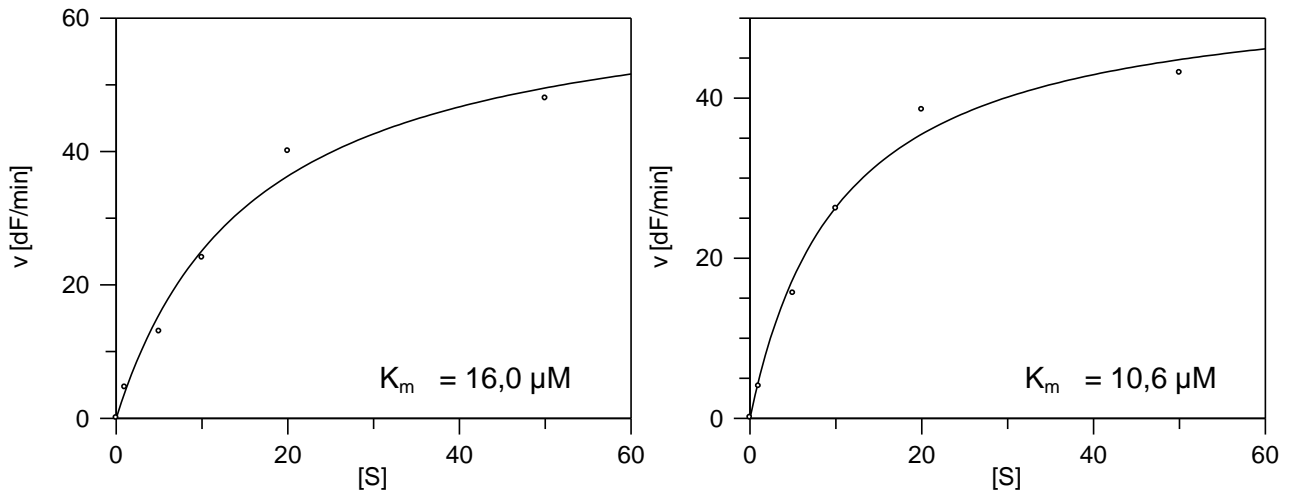


Abbildung 6.6: Gemessene K_m -Werte für Z-Phe-Arg-AMC an Clostripain (Darstellung von zwei Einzelwerten)

Anschließend wurde das in der Literatur als kompetitiver Inhibitor beschriebene Benzamidin nach dem erarbeiteten Assayprotokoll getestet. Dabei wurde untersucht, ob sich der IC_{50} -Wert des Inhibitors durch Zusatz des nichtionischen Detergenz Triton X-100 oder des Thiol donors DTT ändert. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob der Assay-Arbeitsablauf, der für die SARS-CoV M^{pro} verwendet wurde, auf diese Cysteinprotease übertragbar ist.

Zunächst wurde der IC_{50} -Wert ohne jegliche Korrektur gemessen (siehe Abbildung 6.7):

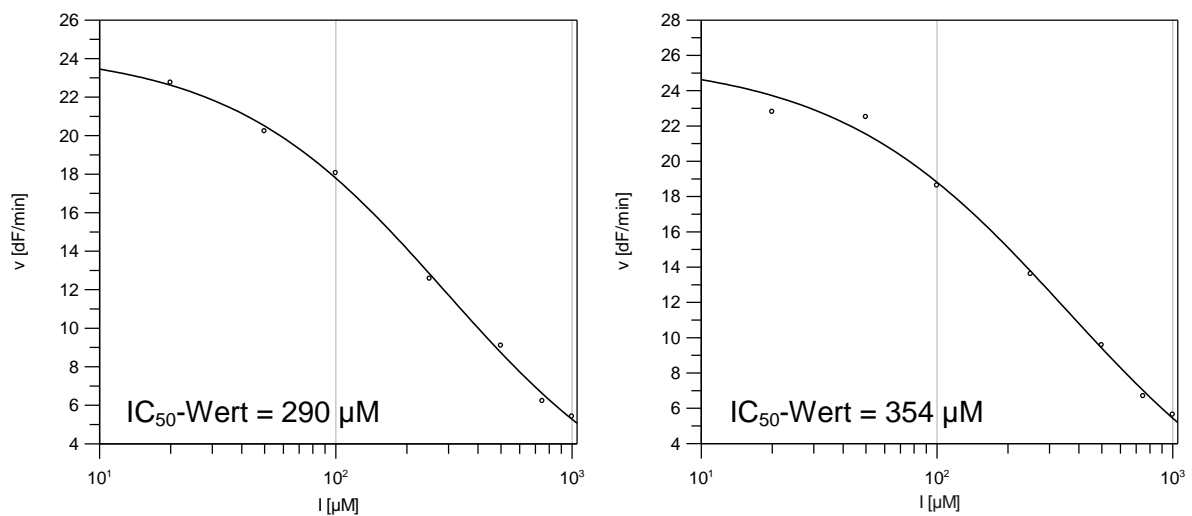


Abbildung 6.7: IC_{50} -Werte für die korrekturfreie Messung von Benzamidin an Clostripain (Darstellung von zwei Einzelwerten)

Anschließend wurde dem Assayansatz Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,01% zugesetzt (siehe Abbildung 6.8):

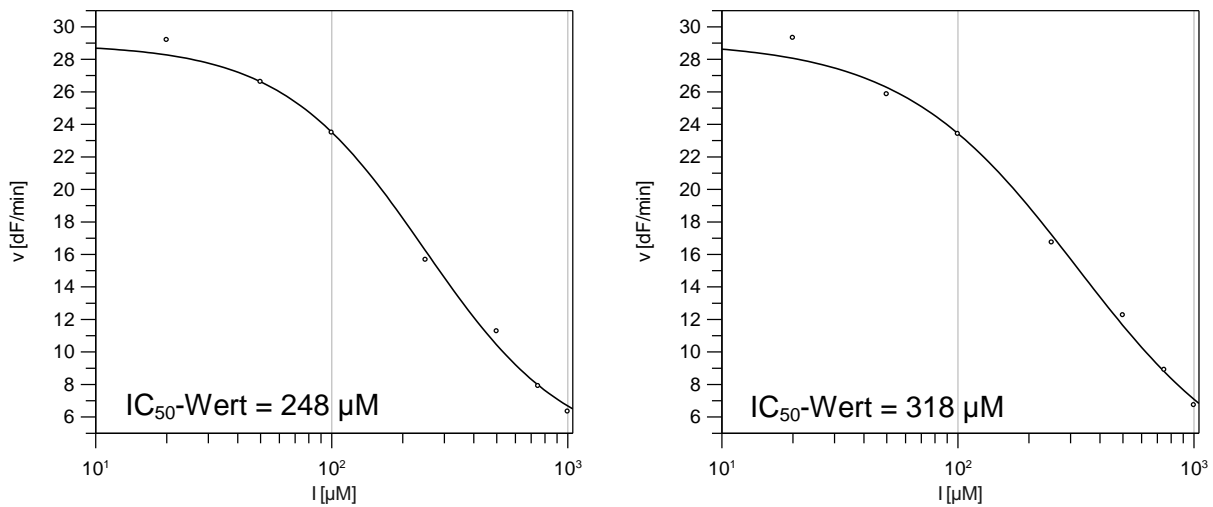


Abbildung 6.8: IC₅₀-Werte für die Messung von Benzamidin an Clostripain unter Zusatz von Triton X-100 (0,01%) (Darstellung von zwei Einzelwerten)

Ebenso wurden die IC₅₀-Werte nach Zusatz von DTT (700 μ M) vermessen (siehe Abbildung 6.9):

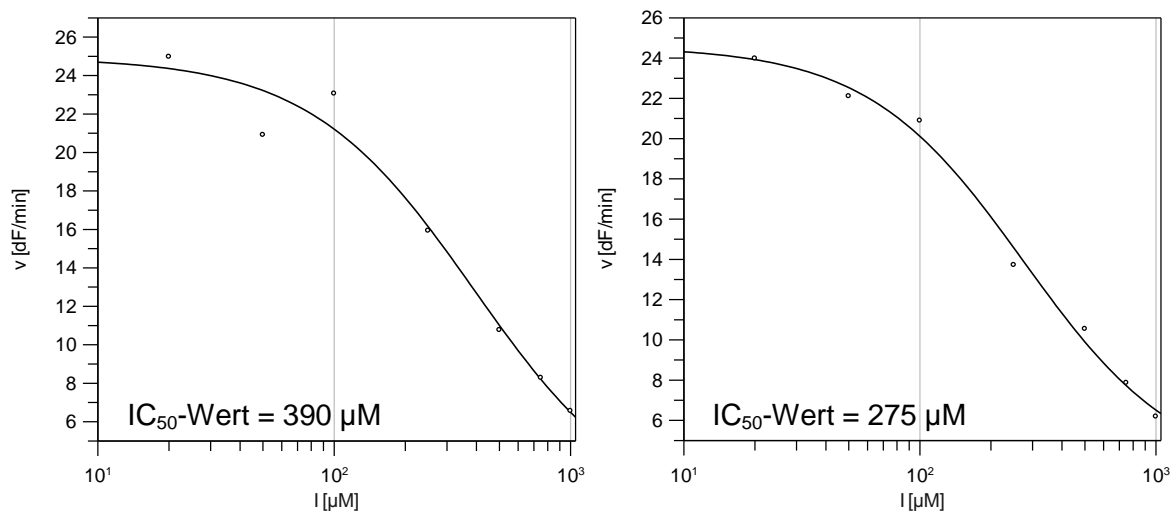


Abbildung 6.9: IC₅₀- Werte für die Messung von Benzamidin an Clostripain unter Zusatz von DTT (700 μ M) (Darstellung von zwei Einzelwerten)

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der Hemmung durch Benzamidin nicht um ein falsch positives Ergebnis handelt. Es liegt weder eine Aggregatbildung noch eine kovalente Bindung vor. Dies war beim Benzamidin auch nicht anders zu erwarten, da hier die Ähnlichkeit zum Arginin genutzt wird^[144] und somit eine Interaktion mit der Arginin-

Bindestelle sehr wahrscheinlich ist. Nach Kembhavi et al.^[142] weist Benzamidin eine reversible Kinetik mit einem K_i -Wert von 240 μM auf. Bei Gusman et al.^[140] wird eine Inhibition von 28 % bei einer Inhibitorkonzentration von 35 μM angegeben. Porter et al.^[145] sowie Siffert et al.^[146] geben für die Hemmung des Clostripains durch Benzamidin eine kompetitive Kinetik an. Benzamidin ist ein Inhibitor für Trypsin-ähnliche Proteasen, zeigt allerdings an Trypsin eine stärkere Hemmwirkung ($K_i = 18,4 \mu\text{M}$ nach Mares-Giua et al.^[144]) als an Clostripain. Benzamidin erschien als eine gute Substanz für die Testung des Clostripain-Assayprotokolls.

Für die Testung der ausgewählten Substanzen aus der Hitvalidierung sollten vor allem falsch positive Ergebnisse an den verschiedenen Cysteinproteasen verifiziert werden. Es erschien jedoch fraglich, ob dies wirklich mit dem erarbeiteten Assay möglich sei, da eigentlich niedrigere DMSO-Konzentrationen optimal sind. Niedrigere DMSO-Konzentrationen sind nicht nur für eine höhere Enzymaktivität von Vorteil, sondern spiegeln auch die physiologischen Gegebenheiten besser wider. So können Probleme in der Löslichkeit von Substanzen in physiologischen Medien bei der Wirkstofffindung besser erkannt werden. Daher sollte für diese Testungen nochmalig der Assay mit der geringeren DMSO-Konzentration von 4% getestet werden.

Damit wurde folgendes Assayprotokoll erstellt:

225 μl 20 mM Tris-Puffer pH 7,5 (Zusatz von 10 mM CaCl_2), 15 μl Enzymlösung, 5 μl Inhibitorlösung und 5 μl Substratlösung wurden je Well versetzt und die Aktivität über einen Zeitraum von 10 min gemessen.

Das Substrat Z-Phe-Arg-AMC wurde weiterhin in einer Endkonzentration von 12 μM verwendet. Ebenso verblieben die Herstellung der Enzymlösung sowie die verwendete Enzymkonzentration aus dem Assayprotokoll in Kapitel 6.2.2.

Das vorliegende Assayprotokoll wurde für die Selektivitätstestung ausgewählter Substanzen aus der Hitvalidierung der SARS-CoV M^{pro} verwendet. Die Ergebnisse dieser Messungen werden in Kapitel 6.5 dargestellt und diskutiert.

6.3 Calpain-1

Bei Calpain-1 (EC 3.4.22.52) handelt es sich um eine ubiquitäre, intrazelluläre Cysteinprotease, die Ca^{2+} -abhängig ist. Daraus resultierte als eine der ersten Bezeichnungen dieser Protease CANP, welches für Calcium-aktivierte Neutralprotease steht.^[10] Der Name Calpain leitet sich vom Ausdruck Calciumion-abhängige Papain-ähnliche Cysteinprotease ab.^[10]

Calpaine bestehen aus zwei Untereinheiten, eine größere katalytische Untereinheit von ca. 80 kDa und eine kleinere regulatorische Untereinheit von ca. 28 bzw. 30 kDa.^[10, 147] Therapeutisch interessant sind vor allem zwei Calpaine, da diese die relevantesten ubiquitär bei Säugern vorliegenden Calpaine sind: Calpain-1 und Calpain-2. Diese beiden Calpaine sind sich strukturell sehr ähnlich. Dabei ist die kleinere Untereinheit bei beiden Proteasen identisch und die größere Untereinheit zu ca. 60 % gleich. Hauptsächlich unterscheiden sich die beiden Calpaine im *in vitro* Bedarf an Calciumkationen. Dabei benötigt Calpain-1 Ca^{2+} -Konzentrationen im mikromolaren und Calpain-2 im millimolaren Bereich. Daher werden diese Calpaine auch als μ - bzw. m-Calpain bezeichnet.^[147, 148]

Durch einen intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} -Ionen kommt es zur Proteolyse des N-Terminus der beiden Untereinheiten.^[15, 149] Es entstehen dadurch zwei kleinere Untereinheiten (76 und 18 kDa), die durch Dissoziation das aktive Zentrum für die Bindung des Substrates freilegen.^[149] Das aktive Zentrum besteht aus einer Triade von Cys 115, His 272 und Asn 296 (Abbildung 6.10).

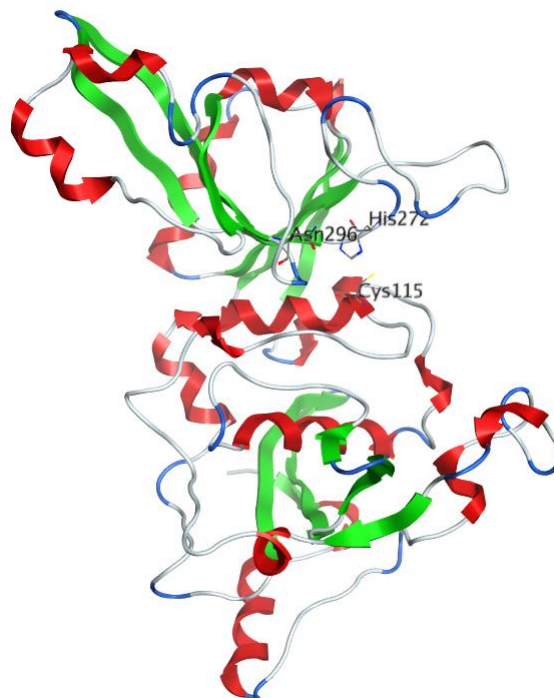


Abbildung 6.10: Kristallstruktur des Calpain- 1 (pdb: 1ZCM)

Als natürliches Substrat wird Casein häufig für *in vitro* Assays verwendet.^[10] Weitere natürliche Substrate sind unter anderem Kollagen, Tropomyosin, β -Actinin, Myosin und Tubulin.^[150] Für fluorimetrische Assays steht eine Vielzahl von Substraten zur Verfügung. Calpain zeigt nur wenig Spezifität hinsichtlich der zu schneidenden Aminosäuresequenz. Vielmehr soll statt der primären Sequenz, die Tertiärstruktur ausschlaggebend sein. Für

fluorimetrische Substrate, die einen Aminomethylcoumarinrest (AMC) tragen, wird angegeben, dass die Hydrolyse begünstigt wird durch Tyrosin, Methionin und Arginin in Position P₁ sowie Leucin und Valin in Position P₂.^[150, 151]

6.3.1 Therapeutische Bedeutung von Calpain-1

Calpaine spielen bei einer Vielzahl von pathogenen Vorgängen eine Rolle. So werden Calpain-1 und -2 beispielsweise mit akuten neurologischen Verletzungen, Schlaganfall und Alzheimer in Verbindung gebracht.^[15, 16]

Die Entstehung der zerebralen Ischämie und einer traumatischen Hirnverletzung resultiert aus einem akuten neuronalen Zelltod, während Alzheimer auch durch einen chronischen neuronalen Zelltod bedingt ist. Bei beiden Krankheitsausbildungen spielt eine Überaktivierung von Calpain-1 und -2 eine große Rolle. Der Überaktivierung des Calpains geht ein erhöhter Calciumeinstrom voraus. Dadurch kommt es im Falle der Ischämie und traumatischen Hirnverletzung zu einer unkontrollierten Hydrolyse von zytoskelettalen Proteinen sowie zytosolischen und nukleären Proteinen, die dann zum neuronalen Zelltod führen. Im Falle der Pathogenese der Alzheimer Krankheit kommt es durch eine Überaktivierung der Calpaine zu einer Umsetzung von p35 zu p25, einer cdk5-Überaktivierung und letztlich zur Ausbildung von neurofibrillären Knäueln und Neurodegeneration.^[16]

6.3.2 Inhibitoren des Calpain-1

Die Aktivität des Calpains wird *in vivo* über den endogenen Inhibitor Calpastatin reguliert.^[149, 152, 153]

Calpastatin besitzt vier äquivalente Domänen, die jeweils einzeln allerdings in unterschiedlicher Stärke Calpain inhibieren können. Die Inhibition des Calpains erfolgt hier sehr selektiv. Gegenüber anderen Proteasefamilien ist Calpastatin inaktiv.^[149]

Die Entwicklung von synthetischen Inhibitoren brachte hauptsächlich peptidische Inhibitoren hervor. Einige nichtpeptidische Inhibitoren werden nach ihrer reaktiven Kopfgruppe klassifiziert.

Dabei treten zum Beispiel Epoxysuccinatderivate wie E-64 als nichtselektive, irreversible Inhibitoren auf. Peptidaldehyde, wie z. B. Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal (ALLN, Leupeptin) binden reversibel kovalent an das aktive Zentrum des Calpain-1. Nachdem solche peptidischen Aldehyde eine schlechte Bioverfügbarkeit besitzen, wurden des Weiteren peptidische Hemiacetale synthetisiert, die als aldehydische Prodrugs fungieren. Auch bei diesen Substanzen ist eine reversible Inhibition zu verzeichnen. Einige Substanzen,

die keine erkennbare reaktive Kopfgruppe aufweisen, zeigen zudem gute Hemmwirkungen wie z.B. 2-Chinolin-4-one oder Peptid-Biphenyl-Hybride.^[149]

6.3.3 Entwicklung eines fluorimetrischen Enzymassays an Calpain-1

Als Referenz für die Entwicklung des Calpain-1-Assays wurden Artikel von Donkor et al.^[154, 155, 156] herangezogen.

Nach Donkor et al.^[154, 155, 156] wird ein 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,4 verwendet dem 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA und 1 mM EGTA zugesetzt sind. Hierbei wird neben EDTA, das zum Abfangen von Schwermetallen zugesetzt wird, auch EGTA verwendet, da es ein spezifischer Komplexbildner für Calciumkationen ist. Da Calpaine durch Calcium aktiviert werden, wird erst zum Start der Messung die Calciumchloridlösung zugegeben. EGTA verhindert somit eine vorherige Aktivierung sowie Autoproteolyse des Enzyms.

Das Substrat Suc-Leu-Tyr-AMC wird bei Donkor et al. in einer Konzentration von 0,2 bis 1,0 mM verwendet, die Enzymkonzentration liegt bei 2 µg in 250 µl Assayvolumen. Die Endkonzentration an DMSO im Assayansatz wird mit 2 % angegeben. Zur Aktivierung des Calpain-1 wird direkt vor Beginn der Messung 5 mM CaCl₂ hinzugefügt.

Bei Calpain-1 besteht das Risiko der Überaktivierung und dadurch der Begünstigung von autoproteolytischen Prozessen. Daher wurden im Vorfeld der Messungen viele Überlegungen der Lagerung der Enzymlösung gewidmet. Um Aktivitätsverlusten durch ständiges Auftauen und wieder Einfrieren entgegenzuwirken, sollte auch diese Proteaselösung in Aliquote geteilt werden. Die vom Hersteller erhaltene Enzymlösung wurde mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml angegeben. Diese Stammlösung wurden nun in zehn Aliquote je 30 µl aufgeteilt und nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingelagert. Nach Auftauen eines Aliquots und Herstellung der gewählten Verdünnung für den Assay, sollte die Lösung nicht wieder eingefroren werden, sondern stattdessen im Kühlschrank gelagert werden. So ist die Aktivität für ein paar Tage noch gegeben.^[157]

Im Folgenden wurden verschiedene Assaybedingungen unter Berücksichtigung der Literaturangaben getestet.^[156] Dazu wurde der Assaypuffer in Anlehnung an Donkor et al. hergestellt. Der Zusatz von DTT wurde ausschließlich für die Verdünnung und Aktivierung der Enzymlösung verwendet, während ein vergleichbarer Ansatz ohne DTT-Zusatz als Assaypuffer diente. Es wurden dabei Enzympufferlösungen mit DTT-Konzentrationen zwischen 2 und 10 mM getestet. Auch der Assaypuffer wurde variiert. So wurden verschiedene NaCl-Konzentrationen, 50 und 200 mM, getestet ebenso wie Assaypufferlösungen mit und ohne Zusatz von EGTA und EDTA. Die Enzymlösung wurde so eingestellt, dass sich für das Calpain-1 Endkonzentrationen zwischen 3,75 und 15 µg/ml

ergaben. Die Substratkonzentration wurde zwischen 20 und 1000 μM Endkonzentration variiert. Für den Start der Reaktion wurden 5 bzw. 10 mM CaCl_2 -Dihydrat zugesetzt.

Dabei zeigte folgendes Assayprotokoll die besten Ergebnisse:

30 μl Enzymaliquot wurde mit einem 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 unter Zusatz von 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 200 mM NaCl sowie 2 mM DTT auf 300 μl verdünnt.

Als Assaypuffer wurde ebenfalls ein 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 verwendet, allerdings nur unter Zusatz von 200 mM NaCl. 150 μl Assaypuffer, 20 μl Enzymverdünnung, 5 μl Inhibitorlösung/ DMSO und 5 μl Substratlösung (1000 μM Endkonzentration) wurden je Well pipettiert und gemischt. Durch Zugabe von 20 μl CaCl_2 -Dihydrat-Lösung (5 mM Endkonzentration) wurde die Reaktion gestartet.

Nach diesem Protokoll wies der Assay eine Enzym-Endkonzentration von 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 0,134 μM sowie eine DMSO-Endkonzentration von 5% auf.

Mit den entwickelten Assaybedingungen sollte nun der K_m -Wert des verwendeten Substrates bestimmt werden (Abbildung 6.11):

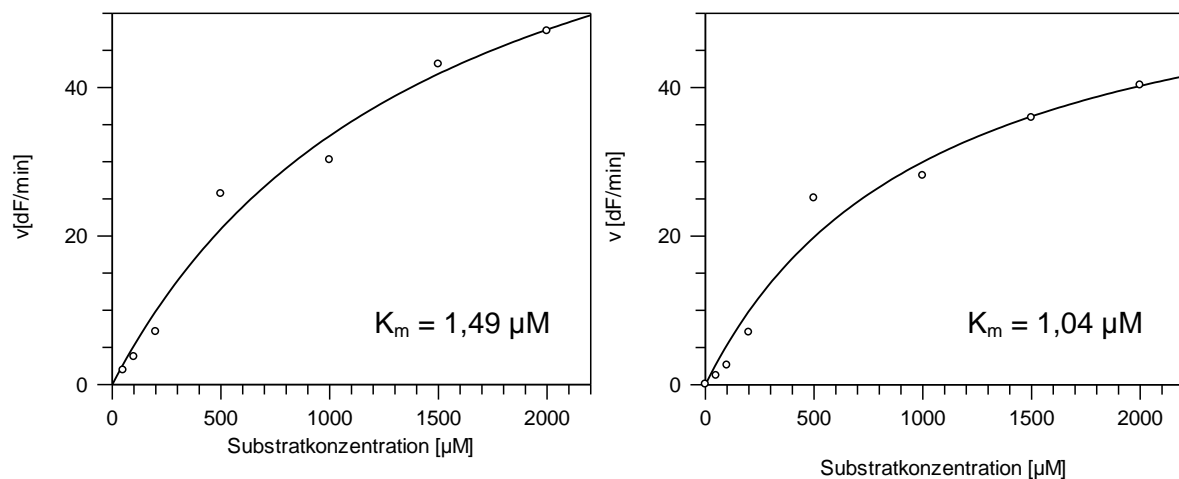


Abbildung 6.11: Bestimmung des K_m - Wertes von Suc-Leu-Tyr-AMC an Calpain-1

Mit der vorliegenden Assaymethode sollten des Weiteren ausgewählte Testsubstanzen aus der Hitvalidierung an der SARS-CoV M^{pro} auf ihre Selektivität untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Testungen sind in Kapitel 6.5 beschrieben.

6.4 Caspase-1

Caspasen sind Cysteinproteasen, die spezifisch Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten. Die Bezeichnung Caspase leitet sich daher aus dem Englischen für cysteiny-l-aspartate specific protease ab. Die meisten Vertreter der Caspasen sind an apoptotischen

Vorgängen beteiligt, Caspase-1 (EC 3.4.22.36) spielt jedoch eine Rolle bei inflammatorischen Ereignissen (Abbildung 6.12).

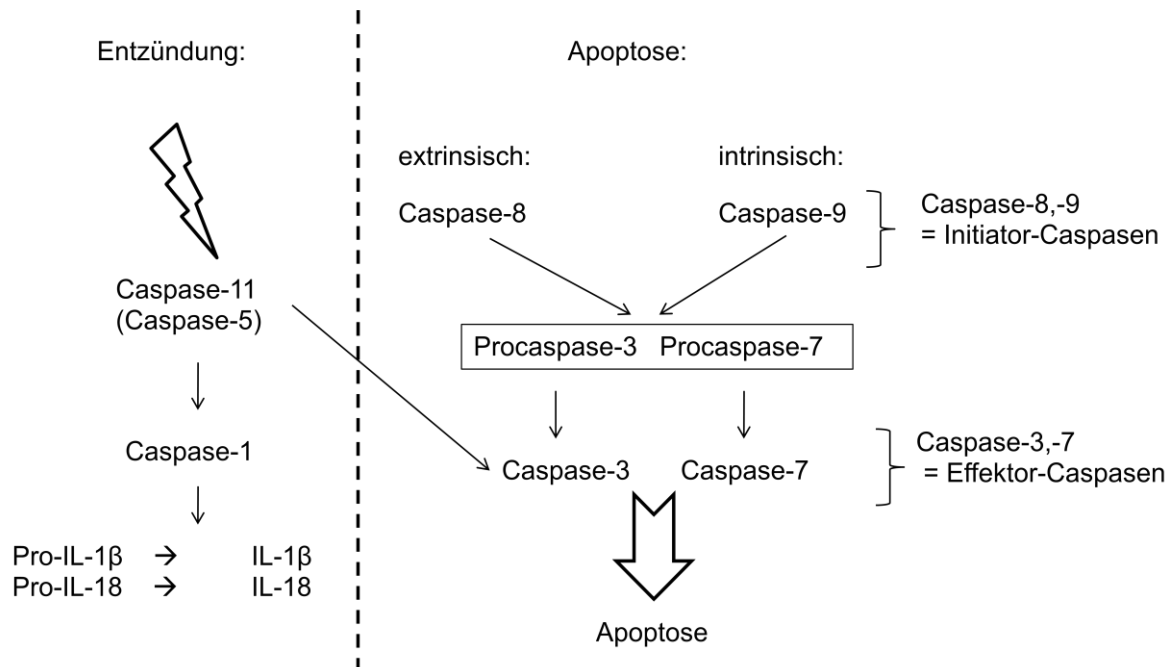


Abbildung 6.12: Die ablaufende inflammatorische und apoptotische Signalkaskade ^[158, 159]

Die Caspase-1 wurde zunächst als Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE) bezeichnet, da es die Produktion des Interleukin-1 β aus Prointerleukin-1 β katalysiert. Dabei wird aus dem 31 kDa schweren Prointerleukin-1 β in das 17,5 kDa schwere Interleukin-1 β abgespalten.^[160] Die Caspase-1 liegt zunächst als 45 kDa schweres Proenzym im Zytosol vor, das durch proteolytische Vorgänge im Zuge einer Entzündung in die aktive Form, bestehend aus zwei Untereinheiten 10 und 20 kDa, überführt wird.^[161] Das aktive Zentrum der Caspase-1 besteht aus Cys 285 und His 237 (Abbildung 6.13).

Die Hydrolyseaktivität der Caspase-1 ist eng verbunden mit einer hohen Spezifität für Aspartat in Position P₁. So wird das natürliche Substrat, das Prointerleukin-1 β , an folgender Position geschnitten: Tyr-Val-His-Asp116↓Ala117.^[10, 162]

Diese hohe Spezifität für Aspartat wird sowohl für die Entwicklung von synthetischen Substraten als auch für selektive Inhibitoren genutzt. So werden Substrate der Form Ac-Tyr-Val-Ala-Asp || X mit X = AMC für kontinuierliche fluorimetrische Assays und mit X = pNA für kolorimetrische Assays verwendet.^[10]

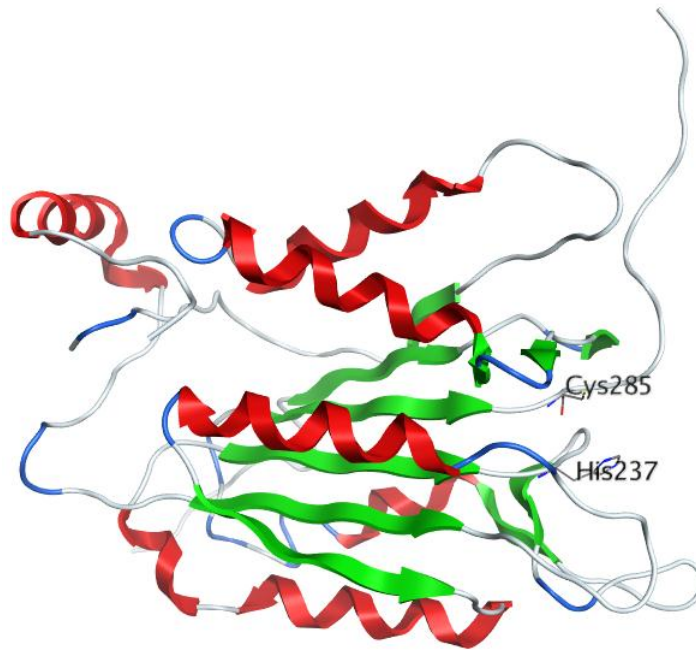


Abbildung 6.13: Kristallstruktur von Caspase-1 (pdb: 1BMQ)

6.4.1 Therapeutische Bedeutung von Caspase-1

Wie in Abbildung 6.12 zu erkennen ist, spielt die Caspase-1 über die Bildung des IL-1 β eine Rolle bei entzündlichen Prozessen wie beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis, beim systemisch inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), bei der Glomerulonephritis sowie bei insulinabhängigem Diabetes mellitus.^[17] Erste Überlegungen widmeten sich der Blockade des Cytokins IL-1. Hierbei wurden in Studien gute Erfahrungen gemacht, doch wirkte sich diese Blockade nicht bei allen entzündlichen Prozessen gleichstark aus.^[4, 17] Daher bietet sich in der Inhibition der Caspase-1 eine gute Möglichkeit der Therapie von entzündlichen Prozessen. Ku et al. führten Studien an Mäusen durch und konnten über die Inhibition der Caspase-1 durch synthetische Inhibitoren die bedeutende therapeutische Rolle der Caspase-1 bei der rheumatoiden Arthritis untermauern.^[17, 158]

Obwohl die Caspase-1 nicht direkt an der apoptotischen Kaskade beteiligt ist, wird eine Inaktivierung dieser Protease mit positiven Effekten auf Krankheitsbilder, die durch apoptotische Vorgänge ausgelöst werden, beschrieben. So soll sich beispielsweise das Ausmaß eines Schlaganfalls verbessern.^[158] Hierbei wird allerdings vermutet, dass diese Verbesserung mit der Unterbindung der Cytokinproduktion einhergeht.

6.4.2 Inhibitoren der Caspase-1

Die meisten der bislang bekannten Caspase-1-Inhibitoren lassen sich in drei Klassen einordnen: Substanzen mit reaktiven Kopfgruppen, Substanzen mit Aspartat in Position P_1 und P_2 - P_4 peptidomimetische Substanzen.^[158] Bei den reaktiven Kopfgruppen handelt es sich um Strukturen, die vom Cystein des aktiven Zentrums nucleophil angegriffen werden können. Daraus kann entweder eine reversible oder eine irreversible Hemmung resultieren.

Beispiele für Substanzen mit reaktiven Kopfgruppen wären zum einen Peptide, die die nötige Erkennungssequenz besitzen und einen Aldehyd- (reversible Inhibition) oder auch Chloromethylketonrest (irreversible Inhibition) aufweisen.

Eine andere Möglichkeit der Inhibitorentwicklung stellt die hohe Selektivität der Caspasen für Aspartat in Position P_1 dar.

Ein vielversprechender Ansatz ergab sich aus den P_2 - P_4 peptidomimetischen Substanzen. Mit Pralnacasan hat das Pharmaunternehmen Vertex einen spezifischen Caspase-1 Inhibitor, der für die Therapie der rheumatoiden Arthritis entwickelt wurde, der sich bereits in klinischen Studien befindet.^[158]

Pralnacasan wird *in vivo* in die aktive Form eines Aldehyds (reaktive Kopfgruppe) überführt (Abb. 6.14).

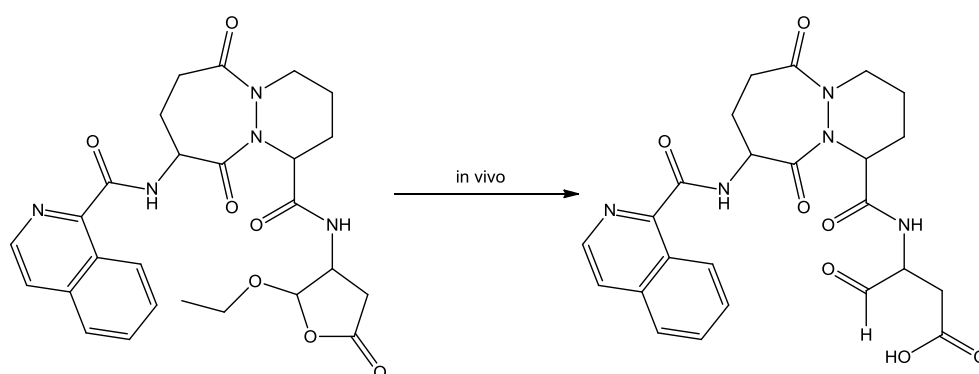


Abbildung 6.14: Pralnacasan (VX- 740) von Vertex

6.4.3 Entwicklung eines fluorimetrischen Enzymassays für Caspase-1

Der fluorimetrische Enzymassay wurde in Anlehnung an Thornberry et al.^[160, 162] durchgeführt. Als Standardpuffer wird in dieser Publikation folgende Zusammensetzung empfohlen: 100 mM HEPES, pH 7,5, 10% (w/v) Sucrose, 0,1% (w/v) CHAPS und 10 mM DTT. Der Zusatz der Sucrose und des zwitterionischen Detergenz CHAPS sollen die Dissoziation der Caspase-1 in ihre inaktiven Untereinheiten vermeiden. CHAPS bietet zudem eine verbesserte Löslichkeit für Proteine.

Daher wurde bei den Testungen eine ähnliche Zusammensetzung des Puffers gewählt, um die Neigung der Caspasen zur Autoproteolyse zu unterdrücken. Statt Sucrose wurde hier Glycerol verwendet.

In Anlehnung an Thornberry et al.^[160, 162] wurde folgende Zusammensetzung verwendet: 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% Glycerol und 0,1% CHAPS, pH 7,4. Als Substrat wurde Ac-Tyr-Val-Asp-AMC verwendet, welches mit einem K_m -Wert von 8,5 μ M (Bachem) bzw. 14 μ M^[160, 162] angegeben wird.

Nach Angabe des Herstellers (Biomol) wurde das lyophilisierte Enzym (100 U (=Unit)) in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), 15% Glycerol rekonstituiert und bei einer Konzentration von 1 U pro μ l gelagert (-80°C). Für die Lagerung wurde die Enzymlösung in je 7,5 μ l (entsprechend 7,5 U) Aliquote aufgeteilt. Als Unit-Definition wurde von Biomol angegeben, dass 1 U die Enzymmenge umfasst, die 1,0 nmol des Substrates YVAD-pNA (Tyr-Val-Ala-Asp-pNA) pro Stunde bei 37°C in einer Pufferlösung der folgenden Zusammensetzung schneidet: 50 mM HEPES, pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT.

Im Folgenden wurden mehrere verschiedene Assayansätze erprobt, um ein geeignetes Assayprotokoll für Caspase-1 zu erstellen.

Dazu wurde der Assaypuffer sowohl mit als auch ohne Zusatz von DTT verwendet, Enzymkonzentrationen zwischen 0,1 und 5 U sowie Substratkonzentrationen zwischen 0,5 und 50 μ M gewählt. Ebenso wurden die Detektorempfindlichkeit sowie die Inkubationstemperatur (Raumtemperatur oder 37°C als Temperaturoptimum) variiert.

Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung von 1 U Enzym und 50 μ M Substrat in einem Assaypuffer, der 2 mM DTT enthält, bei Raumtemperatur die beste Steigung (Fluoreszenzintensitätsänderung pro Zeit) ergab. Durch gezielte Änderungen der Assaybedingungen wie die bereits genannten Temperaturänderungen und Variationen der Detektorempfindlichkeit ließ sich die Enzym- und auch Substratkonzentration nicht weiter senken. Vom ökonomischen Standpunkt aus sind diese Bedingungen nicht optimal. Da sich keine weiteren Verbesserungen der Bedingungen erreichen ließen, sollten unter diesen Gegebenheiten die Testungen erfolgen. Um falsch positive Ergebnisse detektieren zu können, wurden nochmals Veränderungen an den Assaybedingungen vorgenommen. Zwar ist es positiv zu werten, dass es durch den DTT- und CHAPS-Zusatz im Caspase-1 Assaypuffer tendenziell zu keinen unspezifisch-kovalenten bzw. falsch positiven Inhibitionen kommen kann, jedoch sollte für die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der weiteren Cysteinprotease-Assays der finale Assaypuffer möglichst keinen Zusatz von DTT enthalten, um kovalente Binder detektieren zu können. Ebenso sollte der Zusatz des zwitterionischen Detergenz CHAPS auf ein Minimum reduziert werden, um potenzielle Aggregatoren auch weiterhin zu erkennen.

Da DTT wichtig für die Reduktion von Cysteinproteasen ist, wurde der vorherige Assaypuffer verwendet, um das Enzymaliquot 1:10 (1+9) zu verdünnen. Als Assaypuffer wurde nun die obige Zusammensetzung ohne Zusatz von DTT und CHAPS verwendet.

Dadurch wurde die Endkonzentration von DTT auf 90 μM und die Endkonzentration von CHAPS auf 0,0045% gesenkt.

Es wurden auch Testungen durchgeführt, bei denen vollständig auf den Zusatz von CHAPS verzichtet wurde. Hier zeigte sich jedoch eine sehr geringe bis keine Enzymaktivität. Der Zusatz von CHAPS erscheint daher als essentiell für die Caspase-1.

Es ergab sich folgendes Assayprotokoll:

180 μl Assaypuffer, 10 μl Enzymverdünnung, 5 μl Inhibitorlösung/DMSO und 5 μl Substratlösung (50 μM Endkonzentration) wurden je Well gemischt und sofort bei Raumtemperatur gemessen.

Unter den gegebenen Bedingungen wurde anschließend die Michaelis-Menten-Konstante für Ac-Tyr-Val-Asp-AMC unter Verwendung von Substratkonzentrationen zwischen 0 und 200 μM bestimmt (Abbildung 6.15):

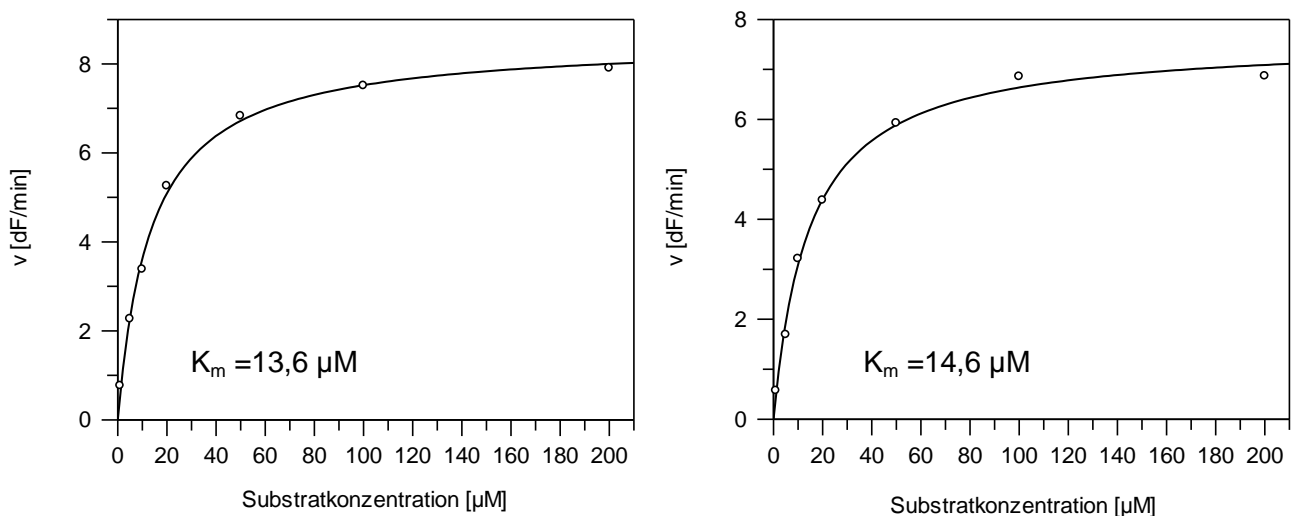


Abbildung 6.15: Bestimmung des K_m -Wertes von Ac-Tyr-Val-Asp-AMC an Caspase-1

Der bestimmte K_m -Wert liegt im Bereich des Wertes, der von Thornberry et al. veröffentlicht wurde. Damit liegt die im Assay verwendete Substratkonzentration mit einer Endkonzentration von 50 μM deutlich über dem K_m -Wert. Allerdings konnte mit geringeren Substratkonzentrationen keine deutliche Steigung detektiert werden. Somit ist der vorliegende Caspase-Assay nicht optimal. Dennoch sollten unter diesen einzig möglichen Bedingungen mit den noch verfügbaren Enzymmengen Testungen, zum Vergleich mit denen an der SARS-CoV M^{pro} , durchgeführt werden, um mögliche falsch positive Ergebnisse zu verifizieren. (Kapitel 6.5)

Neben der Bestimmung des K_m -Wertes sollte auch die Aktivität der Caspase-1 unter den vorliegenden Assaybedingungen näher betrachtet werden:

Die Unitdefinition des Herstellers lautete, wie bereits erwähnt: 1 U umfasst die Enzymmenge, die 1,0 nmol des Substrates YVAD-pNA pro Stunde bei 37°C in einer Pufferlösung der folgenden Zusammensetzung schneidet: 50 mM Hepes, pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT.

Aufgrund dessen, dass bei den vorliegenden Testungen ein fluorimetrisches Substrat verwendet wurde, sollte in Bezug auf das Ac-Tyr-Val-Asp-AMC die Unitdefinition unter den hier verwendeten Assaybedingungen geprüft werden. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit acht AMC-Konzentrationen zwischen 0 und 0,4 μM vermessen. Anschließend erfolgte die Messung von drei Blindwerten bzw. Enzymaktivitätstests. Die daraus resultierenden Graphen wurden übereinander gelegt. Aus den Schnittpunkten der Aktivitätsgeraden mit den Fluoreszenzintensitätsgeraden der AMC-Verdünnungsreihe lässt sich berechnen, welche Menge an AMC aus dem fluorimetrischen Substrat über einem definierten Zeitraum freigesetzt worden ist.

Abbildung 6.16 zeigt eine solche Bestimmung. Aus den drei Aktivitätsbestimmungen wurde für 1 U (nach der Unitdefinition des Herstellers) festgestellt, dass ca. 11 pmol des Substrates Ac-Tyr-Val-Asp-AMC pro Minute bei Raumtemperatur in der vorliegenden Assaypufferlösung geschnitten wird.

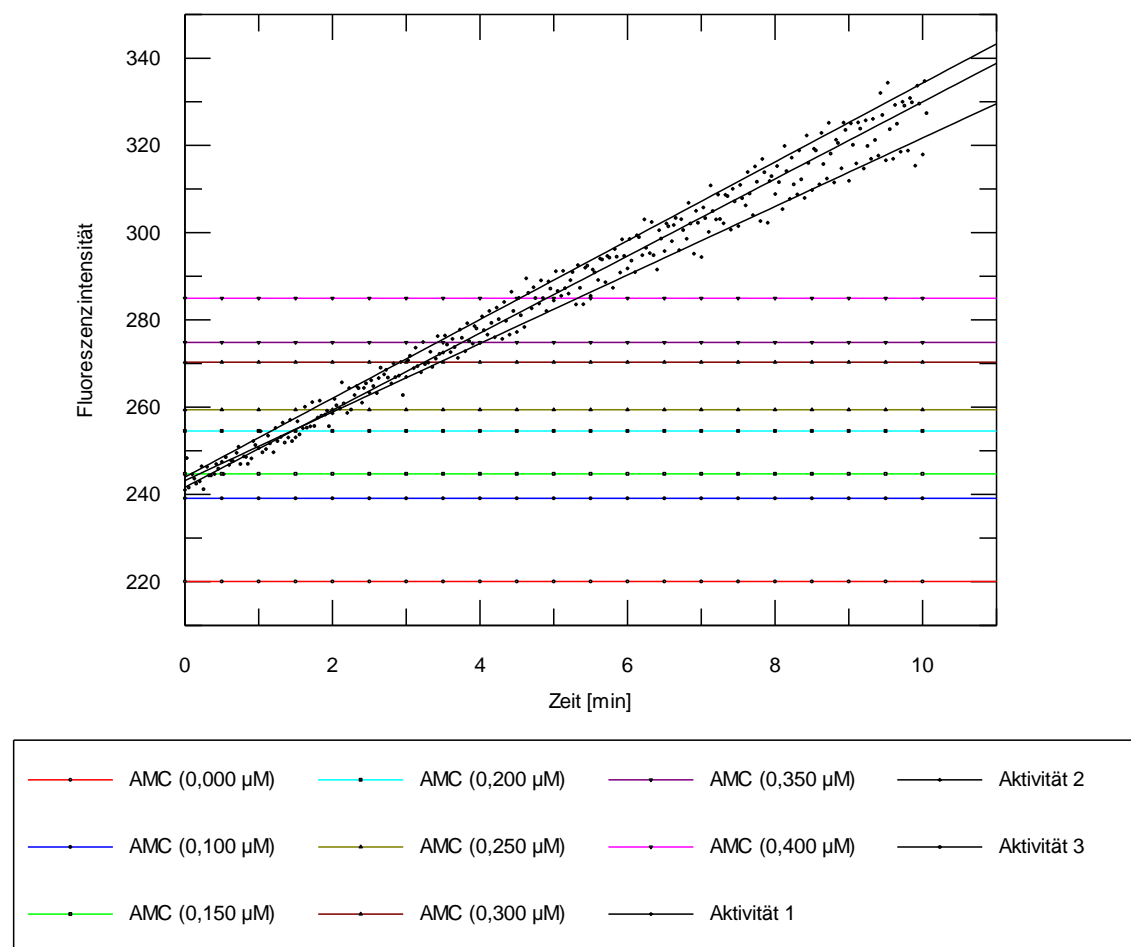


Abbildung 6.16: Bestimmung der Aktivität bzw. Units der verwendeten Caspase-1

6.5 Testung ausgewählter Inhibitoren an verschiedenen Cysteinproteasen

Nach der Entwicklung der fluorimetrischen Enzymassays für Clostripain, Calpain-1 und Caspase-1 sollten nun die ausgewählten Substanzen aus der Testung an der SARS-CoV M^{pro} auf ihre Hemmwirkung an diesen diversen Cysteinproteasen untersucht werden.

Dabei stand vor allem der Aspekt der Überprüfung falsch positiver Hits im Vordergrund.

Daher sollten potenzielle Aggregatoren wie Substanz **7** und **8** weitergehend getestet werden sowie unspezifische kovalente Inhibitoren. Für letzteren Aspekt wurden die Substanzen **1**, **5** und **11** gewählt.

Für diese fünf Substanzen wurden zunächst IC₅₀-Werte an Cathepsin B und Clostripain einmal unter den Standardassaybedingungen ohne Korrekturen und einmal mit der jeweiligen Korrekturbedingung (DTT-Zusatz für die Detektion kovalenter Inhibitoren bzw. Triton X-100 Zusatz für die Detektion von Aggregatoren) gemessen. Dabei werden zur deutlicheren Darstellung die Mittelwerte aus zwei Messungen mit berechneter Standardabweichung (Standardabweichung der Einzelwerte) angegeben. Die jeweiligen Einzelwerte sind dem Anhang zu entnehmen.

Zunächst wurden IC_{50} -Werte an Clostripain bestimmt (Tabelle 6.5):

Tabelle 6.5: Bestimmung der IC_{50} -Werte von potenziell kovalenten Bindern an Clostripain ohne und unter Zusatz von DTT im Assaypuffer

Substanz	IC_{50} [μ M]	IC_{50} nach AMC-Korrektur
1	$76,0 \pm 78,4$ $(8,33 \pm 3,64)^{1)}$	$80,2 \pm 82,4$ $(7,69 \pm 3,17)^{1)}$
1 plus DTT	$313,2 \pm 432,0$ $(17,7 \pm 0,354)^{1)}$	$464,6 \pm 646,1$ $(1156 \pm 1607,1)^{1)}$
5	$8,09 \pm 1,65$	$7,66 \pm 1,74$
5 plus DTT	$17,8 \pm 2,55$	$17,5 \pm 2,62$
11	$0,178 \pm 0,043$	$0,173 \pm 0,044$
11 plus DTT	$0,190 \pm 0,061$	$0,176 \pm 0,049$

¹⁾ Wert unter Herauslassen der Inhibitorkonzentration von 10 μ M bei Substanz 1

Tabelle 6.6: Bestimmung der IC_{50} -Werte von Aggregatoren an Clostripain ohne und unter Zusatz von Triton X-100 im Assaypuffer

Substanz	IC_{50} [μ M]
7	$1,62 \pm 0,276$
7 plus Triton X-100	k. K. ¹⁾
8	$1,43 \pm 0,692$
8 plus Triton X-100	$116,3 \pm 17,5$

¹⁾ k.K. = keine Kurve durch die Messwerte möglich

Wie erwartet lässt sich bei Substanz **1** und **5** feststellen, dass die IC_{50} -Werte unter Zusatz von DTT als alternativen Thiolonor ansteigen (Substanz **1** von 76,0 auf 313 μ M, Substanz **5** von 8,09 auf 17,8 μ M). Dabei ist bei der Testung von Substanz **1** eine hohe Streuung der Werte zu verzeichnen gewesen. Das Herauslassen des Wertes für eine Inhibitorkonzentration von 10 μ M aus der Verdünnungsreihe 0-100 μ M führte zu stabileren Ergebnissen, die durch Wiederholungsmessungen annähernd bestätigt werden konnten (siehe Anhang). Bei Substanz **11** zeigt sich kein Effekt durch den DTT-Zusatz. Dies kann zum einen daran liegen, dass unter den gegebenen Bedingungen die DTT-Konzentration noch nicht ausgereicht hat oder eine längere Inkubationszeit von Nöten wäre. Zum anderen wäre aufgrund des Ergebnisses auch denkbar, dass am Clostripain eine nichtkovalente Interaktion vorliegt und es sich damit um eine Substanz handelt, die selektiv kovalente

Bindungen ausbildet. Daher erscheint es hier interessant, wie sich die Substanz in den Testungen an den weiteren Cysteinproteasen verhält. Allerdings erscheint die These, dass es sich am Clostripain möglicherweise um eine nicht-kovalente Inhibition handelt, aufgrund der hohen Hemmung bei einer recht kleinen Molekülgröße als eher unwahrscheinlich. Daher sollte in einer weiteren Testung zunächst der IC_{50} -Wert dieser Substanz unter Zusatz von DTT nach einer Inkubationszeit von 20 min überprüft werden. Doch auch unter diesen Bedingungen blieb die Hemmwirkung bestehen (siehe Tabelle 6.7).

Tabelle 6.7: Wiederholungsmessung des IC_{50} -Wertes von Substanz 11 an Clostripain nach 20 min Inkubation

Substanz	IC_{50} [μ M]	IC_{50} nach AMC-Korrektur
11	$1,57 \pm 0,559$	$0,166 \pm 0,066$
11 plus DTT (20 min Inkubation bei RT)	$1,96 \pm 0,905^{1)}$	$0,452 \pm 0,443$

¹⁾ hier ein hoher Wert für den slope factor

Die Verifizierung der Aggregatbildung ließ sich anhand des Clostripain-Assays gut durchführen (siehe Tabelle 6.6). Substanz **7** zeigte unter den gegebenen Bedingungen ohne Zusatz von Triton X-100 eine starke Hemmung mit einem IC_{50} -Wert von $1,62 \mu$ M. Nach Zusatz des Detergenz war kaum eine Hemmwirkung in den verschiedenen Inhibitorkonzentrationen zu verzeichnen, so dass sich durch die erhaltenen Werte keine sigmoide Kurve legen ließ.

Auch Substanz **8** wies vor Zugabe des Detergenz einen IC_{50} -Wert im Rahmen von Substanz **7** auf. Nach Zusatz von Triton X-100 stieg der Wert um das 80-fache an (Tabelle 6.6).

Nach diesen Ergebnissen wurden weitere Selektivitätstestungen an Cathepsin B durchgeführt (Tabelle 6.8):

Tabelle 6.8: Bestimmung der IC₅₀-Werte von potenziell kovalenten Bindern an Cathepsin B ohne und unter Zusatz von DTT im Assaypuffer

Substanz	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ nach AMC-Korrektur
1	23,6 ± 1,98	25,2 ± 2,76
1 plus DTT	51,3 ± 0,424	64,8 ± 4,74
5	532,3 ± 112,0	473,1 ± 33,0
5 plus DTT	741,3 ± 882,0	k. K., 78,0
11	118,3 ± 101,2 ¹⁾	70,8 ± 37,4
11 plus DTT	58,0 ± 16,7 ¹⁾	k. K. ²⁾

¹⁾hier ein sehr hoher Wert für den slope factor

²⁾k.K. = keine Kurve durch die Messwerte möglich

Die Werte aus Tabelle 6.8 zeigen, dass sich Substanz **1** als unselektiver kovalenter Inhibitor verifizieren lässt. Substanz **5** zeigt kaum eine Hemmwirkung an Cathepsin B. Die IC₅₀-Werte von Substanz **11** vor Korrektur des inneren Filtereffektes erscheinen fragwürdig, da hier scheinbar eine stärkere Hemmwirkung nach Zusatz von DTT auftritt. Erst die korrigierten Werte (IC₅₀ nach AMC-Korrektur) zeigen, dass es sich um einen kovalenten Inhibitor handelt. Durch Zusatz von DTT weisen die einzelnen Inhibitorkonzentrationen hier keinerlei Hemmwirkung auf, sodass statt einer sigmoiden Kurve sich eher eine Gerade durch die Messpunkte legen ließe (siehe Anhang). Zudem lässt sich feststellen, dass die Hemmwirkung von Substanz **11** an dieser Cysteinprotease, bei weitem nicht so stark ist, wie an der SARS-CoV M^{pro} oder auch an Clostripain.

Tabelle 6.9: Bestimmung der IC₅₀-Werte von Aggregatoren an Cathepsin B ohne und unter Zusatz von Triton X-100 im Assaypuffer

Substanz	IC ₅₀ [μM]
7	119,5 ± 5,52
7 plus Triton X-100	132,7 ± 14,9 ¹⁾
8	77,5 ± 5,80
8 plus Triton X-100	177,3 ± 99,4 ¹⁾

¹⁾hier sehr hohe Werte für den slope factor

Der Effekt der Aggregation fällt unter den gegebenen Bedingungen des Cathepsin B-Assays weitaus geringer als bei der SARS-CoV M^{pro} und Clostripain aus. Wie in Tabelle 6.9 zu sehen, liegt der IC₅₀-Wert von Substanz **7** vor Zusatz von Triton X-100 oberhalb von 100 µM. Bei der Messung unter Zugabe des Detergenz erhöht sich der Wert nicht signifikant. Betrachtet man den slope factor der sigmoiden Kurve, so lässt sich feststellen, dass auch noch unter Zusatz des Detergenz ein relativ hoher Wert von über 3 verbleibt (siehe Anhang, Einzelwerte). Gegebenenfalls reicht hier die Konzentration des Triton X-100 noch nicht aus. Substanz **8** zeigt ebenfalls einen höheren IC₅₀-Wert als an der SARS-CoV M^{pro} und an Clostripain. Die IC₅₀-Kurven von Substanz **8** weisen ebenso noch einen recht hohen slope factor auf. Hier lässt sich jedoch etwas deutlicher als bei Substanz **7** ein Effekt nach Zugabe des Detergenz feststellen (Tabelle 6.9).

Für die weiteren Testungen an den Cysteinproteasen Caspase-1 und Calpain-1 war es aufgrund der Assaybedingungen, vor allem dem Verbrauch an Enzymlösung, nicht möglich IC₅₀-Werte zu messen. Daher wurde für jede Substanz die Inhibition bei einer Konzentration von 20 µM bestimmt, um so den Vergleich zu der Testung an der SARS-CoV M^{pro} herstellen zu können.

Zunächst wurden die ausgewählten Inhibitoren an Caspase-1 getestet (Tabelle 6.10):

Tabelle 6.10: Testung der Inhibition [%] bei 20 µM an Caspase-1

Substanz	Inhibition [%]	nach AMC-Korrektur
1	58,2 ± 5,59	57,6 ± 5,87
1 plus DTT	21,7 ± 2,76	20,6 ± 3,11
5	6,79 ± 2,94	6,55 ± 4,55
5 plus DTT	5,92 ± 2,28	5,72 ± 0,68
11	14,3 ± 3,04	5,77 ± 3,66
11 plus DTT	10,6 ± 3,40	2,10 ± 2,96
7	k.l. ¹⁾	---
7 plus Triton X-100	---	---
8	k.l.	---
8 plus Triton X-100	---	---

¹⁾k.l. = keine Inhibition

Bei der Durchführung der Testung der aggregatbildenden Substanzen **7** und **8** zeigte sich ein Hindernis. Bei der Entwicklung des Assays erschien es in der Theorie bereits problematisch, Aggregate detektieren zu können, da für eine optimale Aktivität der Caspase-1 bereits ein Zusatz des zwitterionischen Detergenz CHAPS von Nöten ist. Der Zusatz wurde zwar auf eine Endkonzentration von 0,0045% gesenkt, jedoch bestand unter diesen Bedingungen, wie die Ergebnisse der Tabelle 6.8 zeigen, keine Möglichkeit die falsch positive Hemmung von Aggregaten zu erkennen. Der Versuch, dieses Detergenz ganz aus dem Assayansatz herauszunehmen, resultierte in der Inaktivität des Enzyms. Daher ist es anhand dieser Assaybedingungen scheinbar nicht möglich ein falsch positives Ergebnis durch Aggregatbildung zu erhalten. Dies scheint zunächst für die hier geplante Beweisführung als Nachteil, ist jedoch es für die Wirkstoffsuche hinsichtlich Caspase-1 als deutlicher Vorteil zu werten, da es aufgrund der Assaybedingungen erst gar nicht zu scheinbaren Inhibitionen durch Aggregation kommen kann. Dieser Effekt wird hier als richtig negativ erkannt.

Die Messung der potenziell kovalenten Inhibitoren zeigte, dass Substanz **1** auch an der Caspase-1 eine unselektive kovalente Bindung ausbildet, während Substanz **5** kaum hemmt und Substanz **11** neben einer sehr geringen Inhibition noch eine ausgeprägte Absorption aufweist.

Weitere Bestimmungen zur Selektivität dieser Inhibitoren wurden nun an Calpain-1 durchgeführt (Tabelle 6.11):

Tabelle 6.11: Testung der Inhibition [%] bei 20 µM an Calpain-1

Substanz	Inhibition [%]	nach AMC-Korrektur
1	37,4 ± 3,47	36,2 ± 2,97
1 plus DTT	8,87 ± 2,73	7,19 ± 1,86
5	0,87 ± 0,33	0,50 ± 0,71
5 plus DTT	0,29 ± 0,41	k.l. ¹⁾
11	13,1 ± 3,54	3,30 ± 4,28
11 plus DTT	k.l.	k.l.
7	k.l.	---
7 plus Triton X-100	k.l.	---
8	k.l.	---
8 plus Triton X-100	k.l.	---

¹⁾k.l. = keine Inhibition

Auch hier ließ sich bei der Messung der potenziell kovalenten Binder ein ähnliches Verhalten wie bei der Testung an der Caspase-1 feststellen.

Substanz **1** zeigte eine unselektive kovalente Bindung, Substanz **5** wies kaum Hemmung auf und Substanz **11** zeigte neben einer wiederum sehr geringen Hemmung auch noch eine zusätzlich merkliche Absorption.

Bei der beabsichtigten Detektion der Aggregatbildner offenbarte sich ein zunächst sehr ungewöhnliches Verhalten. Der Zusatz der Inhibitoren führte nicht wie gewohnt zu einer starken Hemmung des Enzyms sondern, vor allem nach Zusatz von Calmidazoliumchlorid, zu einer gegenüber dem Blindwert ausgeprägteren Fluoreszenzintensitätszunahme über die Zeit.

In Abbildung 6.17 ist dieses Verhalten dargestellt:

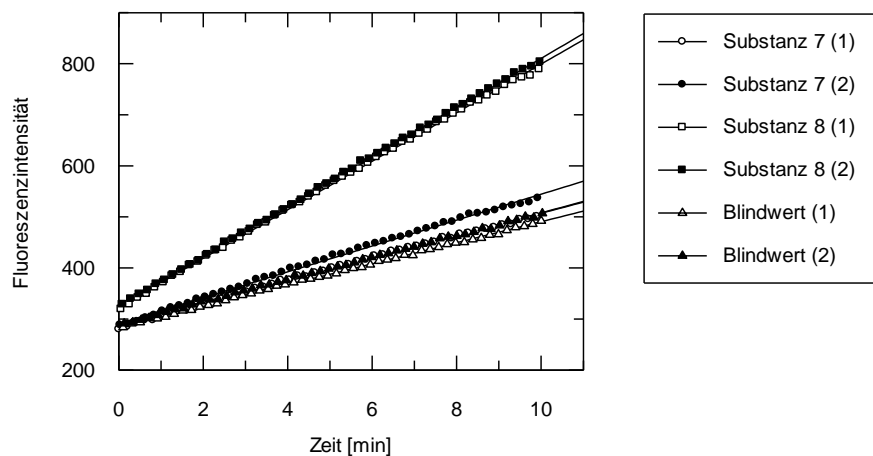


Abbildung 6.17: Testung der potenziell aggregierenden Substanzen 7 und 8 an Calpain-1 in einer Doppelbestimmung

Um zu untersuchen, inwieweit der Zusatz von Triton X-100 einen Einfluss auf diesen Effekt nimmt, wurde anschließend eine solche Messung unter Zusatz des Detergenz durchgeführt. Unter den gewohnten Umständen wäre nach einer starken Hemmung der Aggregate ohne Zusatz des Detergenz im Folgenden dann eine Abnahme dieser falsch positiven Hemmung zu sehen.

Bei dieser Testreihe zeigte sich zwar wie gewohnt, dass sich nach Zusatz des Detergenz die Steigungen (Fluoreszenzintensitätszunahme über die Zeit) der Inhibitor und der Blindwert-Ansätze angleichen (Abbildung 6.18). Die vorherige stärkere Steigung blieb jedoch unklar und konnte im Zuge dieser Messungen aufgrund der geringen Enzymmengen nicht näher untersucht werden.

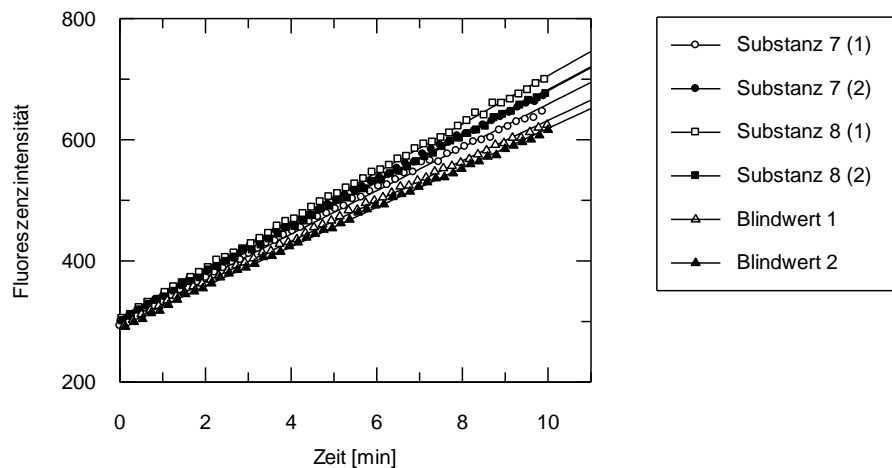


Abbildung 6.18 Testung der potenziell aggregierenden Substanzen 7 und 8 an Calpain-1 in einer Doppelbestimmung unter Zusatz von Triton X-100

6.6 Diskussion der Ergebnisse

Die Testungen zur Selektivität der ausgewählten Inhibitoren führten zu interessanten Ergebnissen. Die ausgewählten Testsubstanzen, die sich im Zuge der Hitvalidierung an der SARS-CoV M^{pro} als Artefakte erwiesen hatten, zeigten zum Teil auch ein eindeutig falsch positives Ergebnis an den vier Cysteinproteasen der Selektivitätstestungen.

Substanz 1 ließ sich an allen vier Cysteinproteasen als unspezifisch kovalenter Inhibitor nachweisen. Substanz 5 zeigte diesen Effekt lediglich deutlich am Clostripain. An den übrigen drei Proteasen wies diese Substanz bereits ohne Zugabe von DTT eine sehr geringe Inhibition auf. Auch Substanz 11 zeigte ein gewisses Maß an Selektivität. Während bei den Messungen am Clostripain sowie im Zuge der Hitvalidierung an der SARS-CoV M^{pro} IC₅₀-Werte unterhalb von 1 µM zu messen waren, lagen die Werte für die übrigen drei Proteasen in deutlich höheren Bereichen.

Die Testsubstanzen 7 und 8 zeigten sich am Clostripain sowie am Cathepsin B ebenso wie in der Hitvalidierung mit deutlich aggregierenden Eigenschaften.

Aufgrund der Assaybedingungen für Calpain-1 sowie Caspase-1 konnte dort keinerlei Inhibition festgestellt werden. Möglicherweise liegt keine Aggregation der Substanzen an diesen beiden Cysteinproteasen vor.

Im Caspase-1-Assay ist jedoch das zwitterionische Detergenz CHAPS enthalten, um die Enzymaktivität zu gewährleisten. Über diese Assaybedingungen kommt es nicht zu Artefakten aufgrund von aggregierenden Substanzen, die fälschlicherweise als Basis für eine weitere Wirkstoffsuche genutzt werden. Diese Substanzen werden über die Assaybedingungen als richtig negativ gewertet werden.

Im Calpain-1-Assay scheint möglicherweise die Zusammensetzung des Assaymediums ebenso einen Einfluss auf eine scheinbare Inhibition zu besitzen.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass sich der erarbeitete Arbeitsablauf gut auf die verwendeten Cysteinproteasen übertragen ließ und dass er somit als wichtiges Instrument zur Verifizierung von Inhibitionsparametern und der Bestimmung der Wertigkeit von Inhibitoren zur weiteren Wirkstoffsuche dienen kann.

7 Zusammenfassung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, einen Arbeitsablauf für fluorimetrische Protease-Assays zu etablieren, um positive Hits von falsch Positiven eindeutig unterscheiden zu können. Der Arbeitsablauf sollte dabei an Cathepsin B und Chymotrypsin erarbeitet werden. Dieser Arbeitsablauf sollte dabei dazu dienen, eine geeignete Leitstruktur für die weitere Suche nach nichtpeptidischen und spezifischen Inhibitoren für die SARS-CoV M^{pro} zu finden. Der Fokus lag dabei besonders auf der Suche nach nichtpeptidischen Inhibitoren, die keine kovalente Bindung zur Protease ausbilden und die einen reversiblen, kompetitiven Hemmmechanismus aufweisen. Irreversible Inhibitoren sind sehr reaktiv. Daher ist es bei solchen Substanzen von großer Bedeutung eine hohe Selektivität zur Zielstruktur zu entwickeln um Toxizität zu vermeiden. Dieser Aspekt gestaltet sich vielfach problematisch, daher sollte der Fokus auf den reversiblen Inhibitoren verbleiben.

Das schwere akute Atemwegssyndrom (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) trat zum erstmals in der Provinz Guangdong in Südchina auf. Im Zeitraum von November 2002 bis Juli 2003 wurden 8096 Fälle gemeldet. In 774 Fällen verlief die Erkrankung tödlich. Als Erreger der Krankheit wurde ein bislang unbekanntes Coronavirus, das SARS-CoV, entdeckt.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine kausale Therapie. Mit antiviralen Mitteln, Steroiden und Antibiotika wurde versucht diese neuartige Infektionskrankheit symptomatisch zu behandeln. Für die Entwicklung von Arzneimitteln, die gezielt gegen SARS eingesetzt werden können, wurde die SARS-CoV Hauptprotease, die für den viralen Lebenszyklus essentielle Bedeutung besitzt, als Target entdeckt.

Für die Testung von Wirkstoffen am betrachteten Target werden verschiedene Assaymethoden, die zumeist auf spektrometrischen Methoden basieren, verwendet. Für die Wertigkeit der Ergebnisse ist ein valider Assay unerlässlich. Die Kenntnis über das Target, die Bedingungen der Messung sowie die Eigenschaften der Testsubstanzen spielt dabei eine große Rolle um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Es konnten verschiedene Ursachen falsch positiver Ergebnisse gefunden werden. Zum einen trägt ein innerer Filtereffekt, der von Testsubstanzen, die im Bereich der Detektionswellenlänge absorbieren, ausgeübt wird, zu einem solchen Ergebnis bei. Des Weiteren konnte als weitaus dominierender falsch positiver Effekt die Aggregation von Testsubstanzen angesehen werden. Ein Arbeitsablauf zur Detektion solcher Ergebnisse und Verifizierung von Hemmkonstanten sowie Kinetiken, konnte am Beispiel des Cathepsin B, als Vertreter der Cysteinproteasen, und Chymotrypsin, dass als Vertreter der Serinproteasen und als strukturähnliche Protease zur SARS-CoV M^{pro}, erfolgreich etabliert werden.

Die Prüfung des inneren Filtereffektes erfolgt dabei zunächst über eine UV-spektrometrische Vermessung der reinen Inhibitorlösung. Das Ausmaß des inneren Filtereffektes wird mit Hilfe eines Korrekturfaktors bestimmt. Dieser bildet den Quotienten aus der Messung der Fluoreszenzintensität des freien Fluoreszenzdonors bezogen auf die Fluoreszenzintensität eines Ansatzes, der zusätzlich die Inhibitorlösung in der betrachteten Konzentration enthält. Dieser Korrekturfaktor dient dabei nicht nur zur Bestimmung des Ausmaßes des inneren Filtereffektes sondern kann direkt in die Berechnung der Inhibition einfließen und somit ein falsch positives Messergebnis korrigieren.

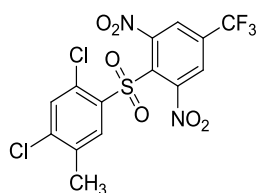
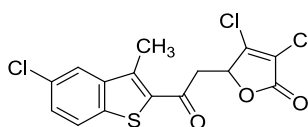
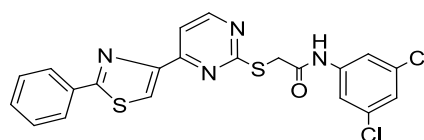
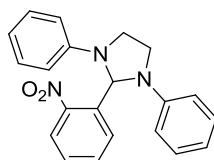
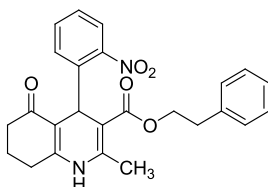
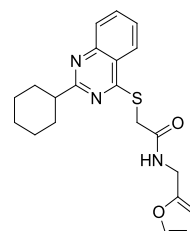
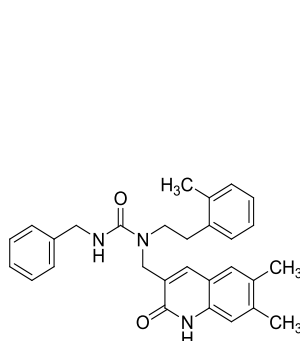
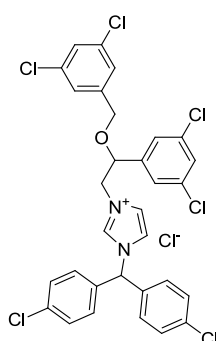
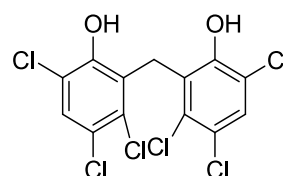
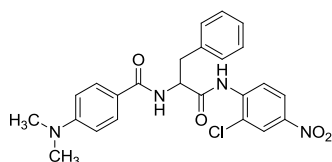
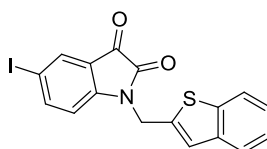
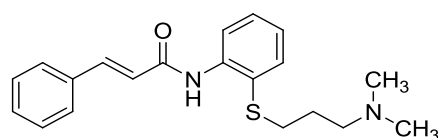
Neben dem inneren Filtereffekt zeigte sich die Aggregation von Inhibitoren als Problematik, die zu falsch positiven Ergebnissen führt. Der Effekt der Aggregation konnte über verschiedene Zusätze im Assaypuffer detektiert werden. So bewirkt die Addition eines nichtionischen Detergenz wie Triton X-100, dass die Aggregation gehemmt bzw. in Abhängigkeit von der Konzentration unterbunden wird. Durch Vergleich dieser Messung mit der ohne Detergenzzusatz lässt sich eine Aussage über die Wertigkeit der Testsubstanz als Inhibitor tätigen. Für diese Messung erwies sich eine Konzentration an Triton X-100 von 0,01% als ausreichend. Anstelle von Triton X-100 ließ sich ebenso bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,1% verwenden.

Ein weiteres Indiz für einen aggregierenden Inhibitor stellt eine nicht-kompetitive Kinetik dar. Durch Messung von Michaelis-Menten-Kinetiken konnte so zusätzlich die Aggregation erwiesen werden. Um Aggregate hinsichtlich ihrer Größenordnung zu untersuchen, wurden als Messtechniken das Dynamic Light Scattering (DLS) sowie zusätzlich zur Visualisierung die Transmissionselektronenmikroskopie angewandt.

Für weitere Aussagen, die die Art der Inhibition bzw. Kinetik betreffen, konnten einfache Messtechniken etabliert werden, wie der Zusatz von DTT in einer Endkonzentration von 700 μM zur Detektion von unspezifisch kovalenten Bindern oder auch die Dialyse, um reversible und irreversible Inhibition zu unterscheiden.

Für einen validen Assay wurden diese verschiedenen Messungen zu einem Arbeitsablauf zusammengefügt.

Anhand des erarbeiteten Arbeitsablaufs wurde eine Hitvalidierung für bereits publizierte Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro} durchgeführt. Dabei wurden nicht-peptidische Inhibitoren, die von den jeweiligen Autoren mit Hemmkonstanten im niedrigen μM Bereich veröffentlicht wurden, gewählt. Vor allem die Inhibitoren, die explizit als kompetitive Hemmsubstanzen angegeben wurden oder Testsubstanzen, zu denen keine Angaben hinsichtlich der Kinetik getroffen wurden, erschienen dabei interessant. Folgende Substanzen wurden für die Testungen gewählt:

**1****2****3****4****5****6****7****8****9****10****11****12**

Die Substanzen **1** bis **10** sowie **12** wurden kommerziell erworben. Substanz **11** wurde nach den Angaben der betreffenden Publikation synthetisiert. Alle Testsubstanzen wurden den Messungen nach dem erarbeiteten Arbeitsablauf unterzogen. Diese Testungen sollten Aussagen zur Wertigkeit der gewählten Substanzen für die Suche nach einer geeigneten Leitstruktur liefern. Zunächst ließ sich feststellen, dass sich der Arbeitsablauf gut auf das Target, die SARS-CoV M^{pro} übertragen ließ. Hinsichtlich der Testsubstanzen zeigte sich, dass beinahe alle betrachteten Inhibitoren aggregierende Effekte aufwiesen oder unspezifische kovalente Bindungen ausbildeten. Damit erschienen diese Substanzen als Basis für die Suche nach einer neuen Leitstruktur nicht geeignet. Vielmehr erschien es als interessante Fragestellung inwieweit sich diese falsch positiven Ergebnisse auch an anderen Proteasen manifestieren. Dazu sollten möglichst verschiedene Cysteinproteasen gewählt

werden. Über einen Sequenzvergleich von pdb-Strukturen kommerziell erhältlicher Cysteinproteasen aus verschiedenen Familien, wurden vier Proteasen mit hinreichender Diversität ausgewählt. Dazu gehören Clostripain aus *Clostridium histolyticum* sowie die humanen Cysteinproteasen Cathepsin B, Calpain-1 und Caspase-1. Nach erfolgreicher Assayentwicklung wurden ausgewählte Testsubstanzen, die sich in der Hitvalidierung an der SARS-CoV M^{pro} als Artefakte erwiesen hatten, an den vier Cysteinproteasen getestet. Dabei zeigte sich, dass auch hier falsch positive Ergebnisse erhalten wurden. Vor allem am Clostripain und Cathepsin B ließen sich die Aggregatoren **7** und **8** verifizieren. Eine unspezifische kovalente Bindung konnte für alle Proteasen für Substanz **1** nachgewiesen werden, während Substanz **5** nur wenig Inhibition an den ausgewählten Proteasen zeigte und Substanz **11** Anzeichen für Selektivität zeigte. An Cathepsin B sowie an Calpain-1 und Caspase-1 war für Substanz **11** eine deutlich verminderte Hemmwirkung feststellbar.

Die Ergebnisse zeigen, welche große Bedeutung ein valider Assay für die Wirkstoffsuche besitzt. Nur mit verifizierten Ergebnissen, die auf mögliche falsch positive Effekte getestet worden sind und sich dabei als „wahre“ Inhibitoren erwiesen haben, kann ein erfolgreiches Wirkstoffdesign durchgeführt werden.

Hier hat sich gezeigt, dass sich anhand eines Arbeitsablaufs mit relativ einfachen Messtechniken falsch positive Ergebnisse detektieren lassen. Ebenso kann die Art der Kinetik untersucht werden. Dieser Arbeitsablauf ließ sich problemlos auf die betrachteten Proteasen übertragen.

Es ist somit sinnvoll für zukünftige Suchen nach Leitstrukturen für Cysteinproteasen, die aufgrund der nucleophilen SH-Gruppe des Cysteins im aktiven Zentrum stark anfällig für unspezifische Bindungen sind, einen solchen Arbeitsablauf als Basis zu verwenden.

8 Summary

The aim of this work was to establish a specific workflow for fluorimetric protease assays to discriminate between positive hits and false positive hits. This workflow was first developed for cathepsin B and chymotrypsin and should serve as a tool for the search for a lead compound of the target protease SARS-CoV M^{pro}. This lead structure should be non-peptidic and ideally inhibits the target non-covalently, reversibly, competitively and selective for this target. Irreversible inhibitors of the SARS-CoV M^{pro} were already known and are typically quite reactive. Therefore these inhibitors need to be selective for the considered target to avoid toxicity. The design of selective irreversible inhibitors was not pursued here.

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) first appeared in Guangdong, a province in the south of China. From November 2002 to July 2003 8096 cases of SARS were reported. 774 patients died of this new infectious disease which was caused by a so far unknown coronavirus. This virus was called SARS-Coronavirus (SARS-CoV).

To date, there is no causal therapy of SARS. Attempts to treat the symptoms of SARS consisted of the application of antivirals, steroids and antibiotics. As a target for developing new specific anti-SARS drugs, SARS-CoV main protease (SARS-CoV M^{pro}) was identified. This protease is essential for viral life cycle.

To examine the inhibitory potency of compounds, different enzymatic assays based on spectrometric measurements can be employed. To obtain reliable results, a valid assay is of utmost importance. Therefore, the knowledge of optimal assay conditions as well as knowledge about the properties of the target and potential inhibitors is needed to avoid false positive results.

Here simple methods to detect false positive results are established.

Various causes of false positive results could be found. First of all, compounds which absorb light at the detection wavelength of the fluorimetric assay pretend an inhibitory effect. Another cause of artefacts is the aggregation of compounds.

A workflow containing measurements to detect those false positive results and to verify the kinetic of compounds could successfully be established for two prototype proteases: cathepsin B as a prototype cysteine protease and chymotrypsin, as a prototype serine protease with structural similarity to SARS-CoV M^{pro}.

Detection of the inner filter effect can easily be carried out by performing a simple UV-spectrometric measurement of the pure compound solution. The extent of the inner filter effect determines the magnitude of a specific correction factor (f_{corr}) which can be used to calculate the true inhibitory potency from the apparent inhibitory potency. f_{corr} is calculated by dividing the measured fluorescence intensity of the free fluorescence donor by the

fluorescence intensity of the free fluorescence donor in the presence of the inhibitor in the applied concentration.

In addition to the inner filter effect, aggregation of compounds is a second and the most frequent reason for false positive results. Aggregation can be detected by different additives in the buffer solution. Non-ionic detergents such as Triton X-100 decrease aggregation. As a consequence, the residual activity of the enzyme increases for aggregating inhibitors by addition of the detergent. Comparing measurements with and without addition of detergent aggregatory effects can easily be detected. For Triton X-100, the concentration could be chosen as 0.01%.

Instead of a nonionic detergent, bovine serum albumin (BSA) can be used as well. Here, the concentration of BSA should be 0.1%.

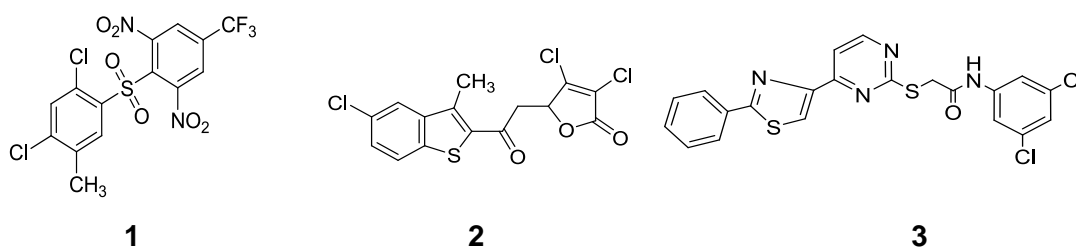
Another indicator for aggregation is a noncompetitive kinetic, which can be verified by measuring a Michaelis-Menten kinetic. For the determination of the size distribution of the aggregates, measurements of Dynamic Light Scattering (DLS) as well as the visualization of the aggregates by Transmission Electron Microscopy (TEM) are recommended with the former analytic method.

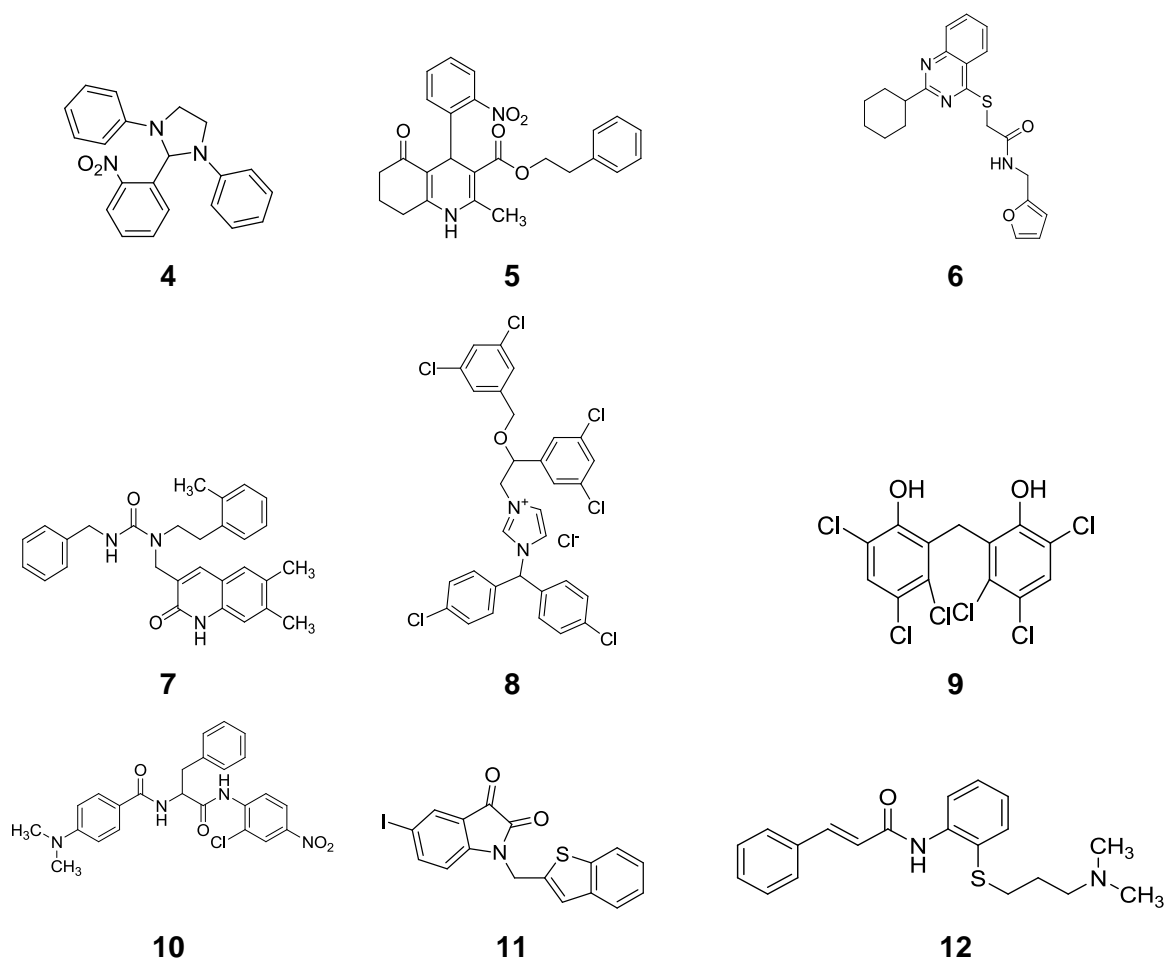
To get to know the exact kinetic of compounds towards a considered target quite simple measurements as the addition of dithiothreitol in a final concentration of 700 μM to detect unspecific covalent bindings or dialysis to verify reversible and irreversible inhibition were established.

The aforementioned methods were compiled into an assay workflow designed to detect false positive hits.

Using this workflow, a hit validation of already published inhibitors of SARS-CoV M^{pro} was performed. Principally nonpeptidic inhibitors with IC₅₀-values or K_i-values in low μM range were considered. Especially inhibitors with no given information about the kind of mechanism of inhibition or a published competitive mechanism of inhibition were of particular interest.

The following compounds were chosen:





Compounds **1** to **10** as well as compound **12** were purchased while compound **11** was synthesized. All these compounds were tested with the developed workflow. The measurements were carried out in order to examine the value of the scrutinized compounds as starting point for the search of a new lead structure. First of all, it could be demonstrated that the developed workflow could easily be transferred from the prototype proteases to the actual target, the SARS-CoV M^{pro}. With regard to the results obtained from the measurements of the workflow none of the compounds could serve as basis for further searches, because nearly all compounds showed false positive effects due to aggregation or bind covalently to the target in an unspecific way.

Afterwards it was investigated whether or not false positive results can be detected at proteases other than those studied so far. For this purpose, a set of diverse cysteine proteases was chosen based on their binding pocket similarities. Commercial availability was a requirement. Four proteases with sufficient diversity were identified including clostripain, derived from *Clostridium histolyticum*, as well as the human cysteine proteases cathepsin B, calpain-1, and caspase-1. After the successful development of the fluorimetric assays for

these proteases, selected compounds which had been proven false positives in the hit validation of SARS-CoV M^{pro}, were tested at these four different proteases. It could be found that the unspecific effects could also be found for this set of diverse cysteine proteases. Especially, in the tests with clostripain and cathepsin B the aggregation of compounds **7** and **8** could be verified. An unspecific covalent binding was proven for compound **1** at all cysteine proteases, whereas only little inhibition of the studied proteases was found for compound **5**. Compound **11**, however, showed some kind of selectivity because the inhibitory effect was significant lower for cathepsin B, calpain-1 and caspase-1 than for clostripain and SARS-CoV M^{pro}.

The results demonstrate the importance of checking for assay artefacts. Only confirmed inhibitory parameters which have been proven to be no false positive effect can help to find new lead structures.

The developed workflow presented here shows that a series of quite simple methods can detect false positives results. Furthermore, kinetics of proven inhibitors can be examined in this series. The workflow could easily be transferred to several scrutinized proteases and is recommended for the future search for protease inhibitors.

9 Experimenteller Teil

9.1 Verwendete Messgeräte

Fluoreszenzspektrometer:

Für den kontinuierlichen fluorimetrischen Assay wurde ein Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrometer der Firma Varian mit Mikrotiterplattenlesegerät verwendet.

Mikrotiterplatten: LumiNunc F96 microwell Platte, weiß, Nunc

Dynamische Lichtstreuung (DLS)/ Photonenkorrelationsspektrometrie (PCS):

Die Messungen wurden am Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instrument, Deutschland, Herrenberg mit einem 4 mW He-/Ne-Laser durchgeführt.

Das Streulicht wurde dabei in einem Winkel von 173° detektiert. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Contin Algorithmus der Malvern DLS Software erzielt.

Das PCS-Gerät wurde vom Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig zur Verfügung gestellt.

Transmissionselektronenmikroskopie:

Für die Abbildung der Aggregate wurde folgendes Transmissionselektronenmikroskop verwendet: LEO EM 922 EFTEM (Leo, Oberkochen, Deutschland). Die Vergrößerung betrug dabei das 16.000-31.500 fache.

Verwendete Messgeräte für die Dialyse:

Dialysekammer:

Für die Versuche wurde eine spezielle Dialysekammer in Anlehnung an den verwendeten Aufbau des Arbeitskreis Schirmeisters der Universität Würzburg angefertigt.

Peristaltische Pumpe:

REGLO Digital MS-2/12, Ismatec (Schweiz)

Dialysemembran:

Dialyseschlauch Visking 27/32, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

Analytische HPLC:

VWR Hitachi Elite LaChrom, L-2130 Pump, L-2200 Autosampler, L-2400 UV-Detektor, Organizer

Säule: LiChroCart ®125-4 LiChrospher® 100RP-18, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Elutionsmittel: Acetonitril: Wasser (50:50)

Flussrate: 1 ml/min, isokratische Elution

Gesamtlaufzeit: 30 min

Detektion: 254 nm

Merck Hitachi, L-6200A Pump, AS-2000A Autosampler, D-6000 Interface, L-7450 LaChrom DAD-Detektor

Säule: LiChroCart ®125-4 LiChrospher® 100RP-18, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Elutionsmittel: Acetonitril: Wasser (50:50)

Flussrate: 1 ml/min, isokratische Elution

Gesamtlaufzeit: 30 min

Detektion: 205, 215, 254, 285 nm

Präparative HPLC:

LaPrep P110 Preparative HPLC Pump, LaPrep P311 Spectralphotometer, LaPrep P216 Fraction Collector,

Säulenrohr Merck: Länge 125 mm, Innendurchmesser 25 mm, verbunden mit einem Merck Selbstfüllstand NW 25

Säulenmaterial: LiChrospher® 100 RP-18, 12 µm, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Probenschleife: maximales Injektionsvolumen 5 ml, Knauer (Berlin, Deutschland)

Elutionsmittel: Acetonitril: Wasser (50:50)

Flussrate: 40 ml/min, isokratische Elution

Gesamtlaufzeit je Ansatz: 30 min

Detektion: 254 nm

¹H-NMR-Spektren und ¹³C-NMR-Spektren:

Bruker Avance DRX-400 (¹H-NMR-Messung: 400 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 100.6 MHz),
Bruker Avance 600 (¹H-NMR-Messung: 600 MHz, ¹³C-NMR-Messung: 150.9 MHz) (NMR-Laboratorium der Chemischen Institute der TU Braunschweig);

Lösungsmittel: [D₆]-DMSO bzw. CDCl₃; Interner Standard : Tetramethylsilan; Angabe der chemischen Verschiebungen in ppm nach der dTMS -Skala.

¹H-NMR: Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration.

Abkürzungen für Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett

Massenspektrometer:

Finnigan-MAT 90 (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig), Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV,
Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard: Perfluorkerosin

Elementaranalyse:

CE Instruments FlashEA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest

UV-Spektrometer:

Specord® 40, Analytik Jena (Jena, Deutschland)

Verwendete Waagen:

Sartorius R 160 P, Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Mettler PC 4400, Mettler (Giessen, Deutschland)

Sartorius MC5, Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Vortexer:

Reax 2000, Heidolph (Schwabach, Deutschland)

Ultraschallbad:

Bandelin Sonorex RK 102, Bandelin (Berlin, Deutschland)

Verwendete Pipetten:

epResearch variable Einkanalpipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Transferpette-8 electronic (2-20 µl, 30-300 µl), Brand (Wertheim, Deutschland)

Verwendete Software:

Die Versuche zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik sowie der IC₅₀-Bestimmungen wurden mittels nicht-linearer Regressionsanalyse mit Hilfe der Enzymkinetik-Software GraFit® (Version 5.0.13), Erithacus Software Limited ausgewertet. Ebenso wurden alle Abbildungen zu den Umsatz-Zeit-Kurven, UV-Spektren und HPLC-Chromatogrammen mit dieser Software angefertigt.

Die Darstellungen der pdb-Kristallstrukturen (www.pdb.org) wurden mit der Software MOE (Version 2010.10)® erstellt.

Die Auswertungen und Simulationen der ^{13}C -NMR-Spektren der Fraktionen aus der Umsetzung von Substanz **1** mit DTT wurden mit Hilfe der Software MestReNova, Version 6.2.0, Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Spanien durchgeführt.

9.2 Verwendete Reagenzien, Enzyme, Substrate

Enzym	Bezugsquelle
Calpain-1, Cathepsin B, Chymotrypsin	Calbiochem
Caspase-1	Biomol
Clostripain	Sigma-Aldrich
SARS-CoV M^{pro}	Prof. Dr. C. Kisker, Universität Würzburg
Substrate	Bezugsquelle
Z-Phe-Arg-AMC,	Bachem
Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC (Ac-YVAD-AMC),	
Suc-Leu-Tyr-AMC	
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	Calbiochem
H₂N-Anthranilsäure-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(NO₂)Tyr-Arg-(MTS), TFA-Salz	Prof. Dr. T. Schirmeister, Universität Würzburg
	GenScript

Die Testsubstanzen wurden von den Herstellern Specs, Asinex, Maybridge und Sigma-Aldrich bezogen und hinsichtlich ihrer Identität nochmalig mittels NMR-Spektrometrie überprüft.

Die Edukte für die Synthese des Isatins wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

weitere Reagenzien	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros Organics
TRIS, CaCl₂*2H₂O, Anthranilsäure (Abz)	Sigma-Aldrich
EDTA, EGTA, Triton X-100, DTT	Fluka
NaCl	Roth
Brij 35, CHAPS	Merck
AMC	Molekula

9.3 Analytische Methoden

Assaybedingungen für die verwendeten Enzyme:

Assaybedingungen für Cathepsin B

Assaypuffer	50 mM Tris-Puffer pH 6,0 mit 5 mM EDTA und 200 mM NaCl
Enzympuffer	50 mM Tris-Puffer pH 6,0 mit 5 mM EDTA, 2,5 mM DTT und 200 mM NaCl
Enzymkonzentration	[E] = 1,05 nM (28,8 ng/ml)
Substrat	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin*HCl [S] = 40 µM
Volumina	205 µl Pufferlösung 15 µl Enzymlösung 25 µl DMSO/ Inhibitorlösung 5 µl Substratlösung <hr/> 250 µl Ansatz

Assaybedingungen für Chymotrypsin

Assaypuffer	50 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit 5 mM EDTA, 100 mM NaCl
Enzympuffer	50 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit 5 mM EDTA, 100 mM NaCl
Enzymkonzentration	[E] = 20 nM (500 ng/ml)
Substrat	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amino-4-methylcumarin [S] = 25 µM
Volumina	220 µl Pufferlösung 5 µl Enzymlösung 20 µl DMSO/ Inhibitorlösung 5 µl Substratlösung <hr/> 250 µl Ansatz

Assaybedingungen für SARS-CoV M^{pro}

Assaypuffer	20 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 0,1 mM EDTA und 200 mM NaCl
Enzympuffer	20 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT und 200 mM NaCl
Enzymkonzentration	[E] = 12,5-18,75 µg/ml
Substrat	H ₂ N-Anthraniisäure-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-(NO ₂)Tyr-Arg-(MTS), TFA-Salz [S] = 100 µM
Volumina	170 µl Pufferlösung 5 µl Enzymlösung 20 µl DMSO/ Inhibitorlösung 5 µl Substratlösung <hr/> 200 µl Ansatz

Assaybedingungen für Clostripain

Assaypuffer	20 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 10 mM CaCl ₂
Enzympuffer	20 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 2 mM DTT, 10 mM CaCl ₂
Enzymkonzentration	[E] = 8,10 µM
Substrat	Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin*HCl [S] = 12 µM
Volumina	225 µl Pufferlösung 15 µl Enzymlösung 5 µl DMSO/ Inhibitorlösung 5 µl Substratlösung <hr/> 250 µl Ansatz

Assaybedingungen für Calpain-1 (μ -Calpain)

Assaypuffer	50 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 50 mM NaCl
Enzympuffer	50 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 1 mM EDTA, 1 mM EGTA und 50 mM NaCl
Calciumchloridlösung	50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit 50 mM Tris pH 7,5
Enzymkonzentration	[E] = 0,134 μM
Substrat	Suc-Leu-Tyr-AMC [S] = 1 mM
Volumina	150 μl Pufferlösung 20 μl Enzymlösung 5 μl DMSO/ Inhibitorlösung 5 μl Substratlösung 20 μl CaCl_2 -Lösung 200 μl Ansatz

Assaybedingungen für Caspase-1

Assaypuffer	50 mM Hepes-Puffer pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerol und 100 mM NaCl
Enzympuffer	50 mM Hepes-Puffer pH 7,4 mit 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,1 % (w/v) CHAPS, 10% (v/v) Glycerol und 100 mM NaCl
Enzymkonzentration	[E] = 1u (Definition des Herstellers)
Substrat	Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AMC (Ac-YVAD-AMC) [S] = 50 μM
Volumina	150 μl Pufferlösung 20 μl Enzymlösung 5 μl DMSO/ Inhibitorlösung 5 μl Substratlösung 20 μl CaCl_2 -Lösung 200 μl Ansatz

Herstellung der Inhibitorlösungen:

Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Im Allgemeinen wurden für die Testungen der Inhibition [%] zunächst Stammlösungen der Inhibitoren mit einer Konzentration von 1 mM hergestellt. Für die IC_{50} -Bestimmungen, wurden Stammlösungen von 5 oder 10 mM hergestellt aus denen eine geeignete Verdünnungsreihe angefertigt wurde. Die Konzentrationen richteten sich dabei danach, welche Inhibition [%] bei 20 μ M gemessen wurde.

Allgemeine Vorschrift zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante:

Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wurde in der Art verfahren, dass die bestehenden Assaybedingungen verwendet wurden unter Austauschen der Inhibitorlösung durch DMSO. Für das Substrat wurden jeweils acht verschiedene Konzentrationen gewählt.

*Allgemeine Vorschriften zur Bestimmung des inneren Filtereffektes:**Korrektur des inneren Filtereffektes von Inhibitoren:*

Bei allen Enzymassays wurde in der Art verfahren, dass die bestehenden Assaybedingungen verwendet wurden unter Austauschen der Substratlösung durch eine entsprechend hergestellte AMC-Lösung bzw. ABz-Lösung. Die Enzymlösung wird dabei durch Assaypuffer ersetzt.

Für Korrekturen mit einer AMC-Lösung wird eine Endkonzentration von 400 nM gewählt, bei der Verwendung der ABz-Lösung zur Korrektur des inneren Filtereffektes beim SARS-CoV M^{pro}-Assay beträgt die Endkonzentration im Well 4 μ M.

Korrektur des inneren Filtereffektes bei FRET-Substraten:

Beim SARS-CoV M^{pro}-Assay muss zusätzlich der innere Filtereffekt des FRET-Substrates korrigiert werden. Dazu wird ähnlich wie bei der Korrektur des inneren Filtereffektes von Inhibitoren vorgegangen. Dabei wird die AMC-Lösung in einer Endkonzentration von 25 μ M als Teil des DMSO-Anteils eingearbeitet. Für den Blindwert wird dabei die Substratlösung durch DMSO ersetzt.

Allgemeine Vorschrift zur Detektion von Aggregaten mittels Triton X-100:

Auch bei diesen Korrekturmessungen sollten die ausgearbeiteten Assaybedingungen bestehen bleiben. Der entscheidende Unterschied zur herkömmlichen Assaymethode ist der Zusatz des nichtionischen Detergenz Triton X-100. Hierbei wurde so verfahren, dass der jeweilige Assaypuffer der Enzymassays in der Weise mit Triton X-100 versetzt wurde, dass eine Endkonzentration von 0,01% (v/v) je Well erreicht wurde.

So wurde beispielsweise für den Cathepsin B-Assay wie folgt vorgegangen:

12,2 µl Triton X-100 wurden zu 10 ml mit dem Assaypuffer (50 mM Tris-Puffer pH 6,0 mit 5 mM EDTA und 200 mM NaCl) versetzt und die entstandene Lösung anschließend nochmals mit Assaypuffer 1:10 (1+9) verdünnt. Dies entspricht einer Konzentration von 0,0122 %. Berechnet je Well resultiert durch die Verdünnung des Assaypuffers von 205 auf 250 µl eine Konzentration von 0,01%.

Ebenso wurde für die weiteren Enzymassays verfahren.

Allgemeine Vorschrift zur Detektion von kovalenten Inhibitoren mittels DTT:

Bei der Detektion kovalenter Inhibitoren wurde methodisch ähnlich wie bei der Detektion von Aggregaten mittels Triton X-100 vorgegangen. Wieder blieben die Assaybedingungen bestehen, mit der Ausnahme, dass dem Assaypuffer nun zusätzlich DTT in einer Endkonzentration von 700 µM zugesetzt wurde.

Als Beispiel soll wiederum der Cathepsin B-Assay dienen:

0,00659 g DTT wurden eingewogen und in 50 ml Assaypuffer gelöst. Dies entspricht einer DTT-Konzentration von 854 µM. Bezogen auf die Verdünnung von 205 µl Puffer zu 250 µl Gesamtansatz je Well lässt sich daraus eine Endkonzentration von 700 µM berechnen.

Ebenso wurde bei den weiteren Enzymen vorgegangen. Dabei ist anzumerken, dass die DTT-Konzentration als additiv zu der DTT-Menge, die bereits der Enzymlösung zur Reduktion der Disulfidbrücken zugesetzt wurde, anzusehen ist.

Der Assayansatz des Cathepsin B-Assays ohne jegliche Korrektur weist bereits über den Enzymassay eine DTT-Konzentration von 150 µM auf. Dies bedeutet, dass effektiv bei der Detektion von kovalenten Inhibitoren eine DTT-Endkonzentration von 850 µM je Well gegenwärtig ist.

Allgemeine Vorschrift zur Detektion von irreversibler bzw. reversibler Inhibition:

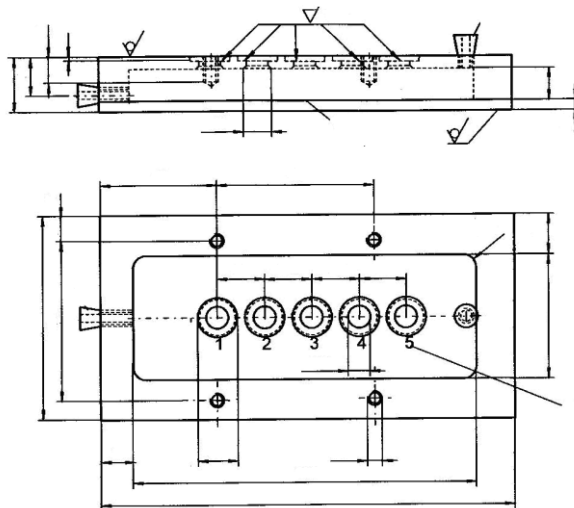
Wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben, wird zur Bestimmung einer möglichen Reversibilität der Inhibitorbindung eine Dialyse durchgeführt.

Dazu wird ein vierfacher Assayansatz in der Art vorbereitet, dass im entsprechenden Assaypuffer das Enzym mit Inhibitorlösung in einem Reaktionsgefäß versetzt wird, zunächst ohne Zugabe von Substrat. Gemäß der Assayvorschrift wird nun das Volumen, das dem Gesamtassayansatz ohne der Substratmenge entspricht, aus dem Reaktionsgefäß entnommen, in ein Well der Mikrotiterplatte pipettiert und nach Zugabe des Substrates die Fluoreszenzintensitätszunahme über die Zeit registriert. Die übrige Lösung aus dem Reaktionsgefäß wird in eine der inneren Dialysekammern auf die Dialysemembran

aufgetragen. Über eine peristaltische Pumpe wird durch die äußere Dialysekammer ständig frische Pufferlösung mit einem der Assayvorschrift entsprechendem DMSO-Gehalt gefördert. Im Falle einer reversiblen Kinetik passiert der Inhibitor die Dialysemembran und wird über die äußere Dialysekammer aus dem System heraus gespült.

In definierten Zeitabständen werden nun Proben gezogen (wieder das Volumen des Gesamtassayansatzes ohne die Substratlösung), mit Substratlösung versetzt und die Inhibition bestimmt. Handelt es sich um einen reversiblen Hemmstoff, so lässt sich feststellen, dass die Inhibition [%] von Probenzug zu Probenzug geringer wird. Im Falle eines irreversiblen Inhibitors bleibt die Hemmwirkung bestehen.

Skizze der verwendeten Dialysekammer:



Vorschrift zur Testung von Hexachlorophen mit einem DMSO-Anteil von 1,75%:

Für die Testung von Hexachlorophen mit einem verminderten DMSO-Anteil wurde eine Stammlösung von 1 mM hergestellt. Dazu wurde nicht wie bisher der Inhibitor in DMSO gelöst sondern in einem Gemisch bestehend aus 50% DMSO und 50% Assaypuffer.

Aus dieser Stammlösung wurden weitere Verdünnungen wie folgt hergestellt, um den gleichen DMSO-Gehalt bei allen Inhibitorkonzentrationen im Assay zu erhalten:

100 μM	→ 50 μl Stammlösung +		450 μl Assaypuffer
50 μM	→ 25 μl Stammlösung +	12,5 μl DMSO +	462,5 μl Puffer
10 μM	→ 10 μl Stammlösung +	45 μl DMSO +	945 μl Puffer

Anschließend wurde nach folgendem Schema in die Mikrotiterplatte je Well pipettiert:

Volumina	172,5 µl	Pufferlösung
	5 µl	Enzymlösung
	20 µl	DMSO/ Inhibitorlösung
	2,5 µl	Substratlösung
<hr/>		
200 µl Ansatz		

Vorschrift zur Testung von verschiedenen DMSO-Anteilen im Clostripain-Assay:

Für die Testung von verschiedenen DMSO-Anteilen im Clostripain-Assay wurde folgendes Pipettierschema je Well verwendet:

Volumina	205 µl	Pufferlösung
	15 µl	Enzymlösung
	25 µl	DMSO-Puffer-Mischung
	5 µl	Substratlösung
<hr/>		
250 µl Ansatz		

Dabei wurden folgende DMSO-Puffer-Mischungen hergestellt:

DMSO + Assaypuffer	resultierender Endgehalt an DMSO im Assay (unter Berücksichtigung des DMSO-Anteils, der über die Substratlösung hinzukommt)
250 µl + 0 µl	12 %
200 µl + 50 µl	10 %
150 µl + 100 µl	8 %
100 µl + 150 µl	6 %
50 µl + 200 µl	4 %
0 µl + 250 µl	2 %

10 Informationen zu den getesteten Substanzen

Die Testsubstanzen **1** bis **10** wurden alle mittels der ^1H -NMR-Spektrometrie auf ihre Identität überprüft, um mögliche Differenzen der Messwerte, die im Rahmen der Hitvalidierung erhalten wurden, zu den publizierten Messwerten aufgrund einer fehlerhaften Substanz auszuschließen.

Substanz **11** wurde im Rahmen der präparativen Arbeit mittels NMR-Spektrometrie sowie Elementaranalyse auf Identität untersucht.

Dabei ergaben sich folgende Signale im NMR-Spektrum:

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7.90 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.46-7.26 (m, 3H), 6.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.16 (s, 2H)

Die Elementaranalyse führte zu folgenden Ergebnissen:

% berechnet: C 48,70, H 2,40, N 3,34, S 7,65; % gefunden: C 49,20, H 2,50, N 3,21, S 7,50

11 Literaturverzeichnis

- (1) Beynon, R. J. Proteolytic enzymes. The practical approach series. **2001**. 247. 2. ed., 1st publ. Oxford Univ. Press., Oxford, England
- (2) Peptidases. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>.
- (3) Barrett, A. J. Classification of peptidases. *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 1-15.
- (4) MEROPS - the Peptidase Database. <http://merops.sanger.ac.uk/>.
- (5) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **1993**, *290* (Pt 1), 205-218.
- (6) Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol Chem* **2001**, *382*, 727-733.
- (7) Otto, H.-H.; Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev* **1997**, *97*, 133-172.
- (8) Turk, V.; Turk, B.; Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* **2001**, *20*, 4629-4633.
- (9) Dickinson, D. P. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* **2002**, *13*, 238-275.
- (10) Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. **2004** Handbook of proteolytic enzymes. Elsevier. 2. ed., Amsterdam, Niederlande
- (11) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 461-486.
- (12) Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 785-799.
- (13) Turk, D.; Turk, B.; Turk, V. Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochem Soc Symp* **2003**, 15-30.
- (14) Fricker, S. P. Cysteine proteases as targets for metal-based drugs. *Metallomics* **2010**, *2*, 366-377.
- (15) Wang, K. K.; Yuen, P. W. Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci* **1994**, *15*, 412-419.
- (16) Huang, Y.; Wang, K. K. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* **2001**, *7*, 355-362.
- (17) Ku, G.; Faust, T.; Lauffer, L. L.; Livingston, D. J.; Harding, M. W. Interleukin-1 beta converting enzyme inhibition blocks progression of type II collagen-induced arthritis in mice. *Cytokine* **1996**, *8*, 377-386.
- (18) Storer, A. C.; Menard, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 486-500.

-
- (19) Rzychon, M.; Chmiel, D.; Stec-Niemczyk, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* **2004**, *51*, 861-873.
- (20) Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, *27*, 157-162.
- (21) Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* **2002**, *102*, 4459-4488.
- (22) Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R. A.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* **1991**, *10*, 2321-2330.
- (23) Aronson, N. N.; Barrett, A. J. The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochem J* **1978**, *171*, 759-765.
- (24) Mort, J. S.; Buttle, D. J. Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* **1997**, *29*, 715-720.
- (25) Barrett, A. J.; Kirschke, H. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *Methods Enzymol* **1981**, *80 Pt C*, 535-561.
- (26) Severe acute respiratory syndrome (SARS): Status of the outbreak and lessons for the immediate future. http://www.who.int/csr/media/sars_wha.pdf.
- (27) Epidemiologisches Bulletin.
http://www.rki.de/CLN_160/nn_504492/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2004/08__04,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/08_04.pdf.
- (28) Stadler, K.; Masignani, V.; Eickmann, M.; Becker, S.; Abrignani, S.; Klenk, H.-D.; Rappuoli, R. SARS-beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* **2003**, *1*, 209-218.
- (29) Thomas, P. A. Severe acute respiratory syndrome. *Indian J Med Microbiol* **2003**, *21*, 152-160.
- (30) Laboratory confirmation of a SARS case in southern China - update 2, 5 January 2004. http://www.who.int/csr/don/2004_01_05/en/.
- (31) Update 49 - SARS case fatality ratio, incubation period.
http://www.who.int/csr/sars/archive/2003_05_07a/en/.
- (32) J. S M Peiris; Guan, Y.; Yuen, K. Y. Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med* **2004**, *10*, S88-S97.
- (33) Christian, M. D.; Poutanen, S. M.; Loutfy, M. R.; Muller, M. P.; Low, D. E. Severe acute respiratory syndrome. *Clin Infect Dis* **2004**, *38*, 1420-1427.
- (34) Preliminary Clinical Description of Severe Acute Respiratory Syndrome.
<http://www.who.int/csr/sars/clinical/en/>.

- (35) Globaler Alarm.
http://www.rki.de/cIn_153/nn_504492/DE/Content/InfAZ/N/Neue__Infektionskrankheit/en/Globaler-Alarm,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Globaler-Alarm.pdf.
- (36) Diseases Global Outbreak Alert & Response Network Biorisk Reduction Alert, verification and public health management of SARS in the post-outbreak period, 14 August 2003. <http://www.who.int/csr/sars/postoutbreak/en/>.
- (37) Diagnostik von SARS-Verdachtsfällen (SARS-Virus-Diagnostik).
http://www.rki.de/cIn_153/nn_504492/DE/Content/InfAZ/S/SARS/Diagnostik.html.
- (38) Rainer, T. H. Severe acute respiratory syndrome: clinical features, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* **2004**, 10, 159-165.
- (39) Snell, N. J. Ribavirin-current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin Pharmacother* **2001**, 2, 1317-1324.
- (40) Fujii, T.; Nakamura, T.; Iwamoto, A. Current concepts in SARS treatment. *J Infect Chemother* **2004**, 10, 1-7.
- (41) Cinatl, J.; Morgenstern, B.; Bauer, G.; Chandra, P.; Rabenau, H.; Doerr, H. W. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* **2003**, 362, 293-294.
- (42) So, L. K.-Y.; Lau, A. C. W.; Yam, L. Y. C.; Cheung, T. M. T.; Poon, E.; Yung, R. W. H.; Yuen, K. Y. Development of a standard treatment protocol for severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **2003**, 361, 1615-1617.
- (43) Sirois, S.; Zhang, R.; Gao, W.; Gao, H.; Li, Y.; Zheng, H.; Wei, D.-Q. Discovery of Potent Anti-SARS-CoV MPro Inhibitors. *Curr Comput - Aided Drug Des* **2007**, 3, 191–200.
- (44) Cinatl, J.; Morgenstern, B.; Bauer, G.; Chandra, P.; Rabenau, H.; Doerr, H. W. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet* **2003**, 361, 2045–2046.
- (45) Gillim-Ross, L.; Subbarao, K. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clinical microbiology reviews* **2006**, 19, 614–636.
- (46) Drosten, C.; Günther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H.-R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R. A. M.; Berger, A.; Burguière, A.-M.; Cinatl, J.; Eickmann, M.; Escriou, N.; Grywna, K.; Kramme, S.; Manuguerra, J.-C.; Müller, S.; Rickerts, V.; Stürmer, M.; Vieth, S.; Klenk, H.-D.; Osterhaus, A. D. M. E.; Schmitz, H.; Doerr, H. W. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **2003**, 348, 1967-1976.
- (47) Peiris, J. S. M.; Lai, S. T.; Poon, L. L. M.; Guan, Y.; Yam, L. Y. C.; Lim, W.; Nicholls, J.; Yee, W. K. S.; Yan, W. W.; Cheung, M. T.; Cheng, V. C. C.; Chan, K. H.; D. N C

- Tsang; R. W H Yung; Ng, T. K.; Yuen, K. Y.; S. A. R. S. study group Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **2003**, 361, 1319-1325.
- (48) Ksiazek, T. G.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S.; Zaki, S. R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J. A.; Lim, W.; Rollin, P. E.; Dowell, S. F.; Ling, A.-E.; Humphrey, C. D.; Shieh, W.-J.; Guarner, J.; Paddock, C. D.; Rota, P.; Fields, B.; DeRisi, J.; Yang, J.-Y.; Cox, N.; Hughes, J. M.; LeDuc, J. W.; Bellini, W. J.; Anderson, L. J.; S. A. R. S. Working Group A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **2003**, 348, 1953-1966.
- (49) Fouchier, R. A. M.; Kuiken, T.; Schutten, M.; van Amerongen, G.; Gerard J J van Doornum; van den Hoogen, B. G.; Peiris, M.; Lim, W.; Stöhr, K.; Osterhaus, A. D. M. E. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **2003**, 423, 240.
- (50) Kuiken, T.; Fouchier, R. A. M.; Schutten, M.; Rimmelzwaan, G. F.; van Amerongen, G.; van Riel, D.; Laman, J. D.; Jong, T. de; van Doornum, G.; Lim, W.; Ling, A. E.; Chan, P. K. S.; Tam, J. S.; Zambon, M. C.; Gopal, R.; Drosten, C.; van der Werf, S.; Escriou, N.; Manuguerra, J.-C.; Stöhr, K.; Peiris, J. S. M.; Osterhaus, A. D. M. E. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **2003**, 362, 263-270.
- (51) Siddell, S.; Wege, H.; Meulen, V. T. The biology of coronaviruses. *J Gen Virol* **1983**, 64 (Pt 4), 761-776.
- (52) Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J. P.; Peñaranda, S.; Bankamp, B.; Maher, K.; Chen, M.-H.; Tong, S.; Tamin, A.; Lowe, L.; Frace, M.; DeRisi, J. L.; Chen, Q.; Wang, D.; Erdman, D. D.; Teresa C T Peret; Burns, C.; Ksiazek, T. G.; Rollin, P. E.; Sanchez, A.; Liffick, S.; Holloway, B.; Limor, J.; McCaustland, K.; Olsen-Rasmussen, M.; Fouchier, R.; Günther, S.; Albert D M E Osterhaus; Drosten, C.; Pallansch, M. A.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **2003**, 300, 1394-1399.
- (53) Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhwani, P.; Mesters, J. R.; Hilgenfeld, R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* **2003**, 300, 1763-1767.
- (54) Snijder, E. J.; Bredenbeek, P. J.; Dobbe, J. C.; Thiel, V.; Ziebuhr, J.; Leo L M Poon; Guan, Y.; Rozanov, M.; Spaan, W. J. M.; Gorbalenya, A. E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* **2003**, 331, 991-1004.
- (55) Bartlam, M.; Xue, X.; Rao, Z. The search for a structural basis for therapeutic intervention against the SARS coronavirus. *Acta Crystallogr A* **2008**, 64, 204-213.

- (56) Schmitz, H.; Drosten, C. Die Bedeutung von Coronaviren. Das Beispiel SARS. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **2004**, *47*, 647–652.
- (57) Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Huang, Y.; Yuen, K.-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* **2009**, *234*, 1117-1127.
- (58) Guan, Y.; Zheng, B. J.; He, Y. Q.; Liu, X. L.; Zhuang, Z. X.; Cheung, C. L.; Luo, S. W.; Li, P. H.; Zhang, L. J.; Guan, Y. J.; Butt, K. M.; Wong, K. L.; Chan, K. W.; Lim, W.; Shortridge, K. F.; Yuen, K. Y.; Peiris, J. S. M.; Poon, L. L. M. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* **2003**, *302*, 276-278.
- (59) Lau, S. K. P.; Woo, P. C. Y.; Li, K. S. M.; Huang, Y.; Tsoi, H.-W.; Wong, B. H. L.; Wong, S. S. Y.; Leung, S.-Y.; Chan, K.-H.; Yuen, K.-Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 14040-14045.
- (60) Zhong, N. S.; Zheng, B. J.; Li, Y. M.; Poon; Xie, Z. H.; Chan, K. H.; Li, P. H.; Tan, S. Y.; Chang, Q.; Xie, J. P.; Liu, X. Q.; Xu, J.; Li, D. X.; Yuen, K. Y.; Peiris; Guan, Y. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* **2003**, *362*, 1353-1358.
- (61) Ziebuhr, J. Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Curr Opin Microbiol* **2004**, *7*, 412-419.
- (62) Holmes, K. V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Invest* **2003**, *111*, 1605-1609.
- (63) Thiel, V.; Ivanov, K. A.; Putics, A.; Hertzog, T.; Schelle, B.; Bayer, S.; Weissbrich, B.; Snijder, E. J.; Rabenau, H.; Doerr, H. W.; Gorbalenya, A. E.; Ziebuhr, J. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **2003**, *84*, 2305-2315.
- (64) Brierley, I.; Digard, P.; Inglis, S. C. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **1989**, *57*, 537-547.
- (65) Marra, M. A.; Jones, S. J. M.; Astell, C. R.; Holt, R. A.; Brooks-Wilson, A.; Yaron S N Butterfield; Khattra, J.; Asano, J. K.; Barber, S. A.; Chan, S. Y.; Cloutier, A.; Coughlin, S. M.; Freeman, D.; Girn, N.; Griffith, O. L.; Leach, S. R.; Mayo, M.; McDonald, H.; Montgomery, S. B.; Pandoh, P. K.; Petrescu, A. S.; Robertson, A. G.; Schein, J. E.; Siddiqui, A.; Smailus, D. E.; Stott, J. M.; Yang, G. S.; Plummer, F.; Andonov, A.; Artsob, H.; Bastien, N.; Bernard, K.; Booth, T. F.; Bowness, D.; Czub, M.; Drebot, M;

- Fernando, L.; Flick, R.; Garbutt, M.; Gray, M.; Grolla, A.; Jones, S.; Feldmann, H.; Meyers, A.; Kabani, A.; Li, Y.; Normand, S.; Stroher, U.; Tipples, G. A.; Tyler, S.; Vogrig, R.; Ward, D.; Watson, B.; Brunham, R. C.; Krajden, M.; Petric, M.; Skowronski, D. M.; Upton, C.; Roper, R. L. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **2003**, *300*, 1399-1404.
- (66) Li, W.; Moore, M. J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S. K.; Berne, M. A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T. C.; Choe, H.; Farzan, M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **2003**, *426*, 450–454.
- (67) Yang, H.; Yang, M.; Ding, Y.; Liu, Y.; Lou, Z.; Zhou, Z.; Sun, L.; Mo, L.; Ye, S.; Pang, H.; Gao, G. F.; Anand, K.; Bartlam, M.; Hilgenfeld, R.; Rao, Z. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 13190-13195.
- (68) Lai, L.; Han, X.; Chen, H.; Wei, P.; Huang, C.; Liu, S.; Fan, K.; Zhou, L.; Liu, Z.; Pei, J.; Liu, Y. Quaternary structure, substrate selectivity and inhibitor design for SARS 3C-like proteinase. *Curr Pharm Des* **2006**, *12*, 4555-4564.
- (69) Anand, K.; Palm, G. J.; Mesters, J. R.; Siddell, S. G.; Ziebuhr, J.; Hilgenfeld, R. Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *EMBO J* **2002**, *21*, 3213-3224.
- (70) Hsu, W.-C.; Chang, H.-C.; Chou, C.-Y.; Tsai, P.-J.; Lin, P.-I.; Chang, G.-G. Critical assessment of important regions in the subunit association and catalytic action of the severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 22741-22748.
- (71) Liang, P.-H. Characterization and inhibition of SARS-coronavirus main protease. *Curr Top in Med Chem* **2006**, *6*, 361–376.
- (72) Chen, S.; Luo, H.; Chen, L.; Chen, J.; Shen, J.; Zhu, W.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. An overall picture of SARS coronavirus (SARS-CoV) genome-encoded major proteins: structures, functions and drug development. *Curr Pharm Des* **2006**, *12*, 4539-4553.
- (73) Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev* **2002**, *102*, 4639-4750.
- (74) Bacha, U.; Barrila, J.; Gabelli, S. B.; Kiso, Y.; Mario Amzel, L.; Freire, E. Development of broad-spectrum halomethyl ketone inhibitors against coronavirus main protease 3CL(pro). *Chem Biol & Drug Des* **2008**, *72*, 34–49.

- (75) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Protease Inhibitors. http://pharm.swu.ac.th/web_npec/content/JOURNAL/Severe%20Acute%20Respiratory%20Syndrome%20Coronavirus%20%28SARS-CoV%29%20Protease.pdf.
- (76) Klebe, Gerhard. **2009** Wirkstoffdesign. Spektrum Akademischer Verlag. 2., überarb. und erw., Heidelberg, Deutschland
- (77) Willett, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discov Today* **2006**, 11, 1046–1053.
- (78) Copeland, R. A. **2005**, Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. Methods of biochemical analysis. Wiley-Interscience, v. 46, Hoboken, N.J., USA
- (79) Zhang, X. W.; Yap, Y. L. Old drugs as lead compounds for a new disease? Binding analysis of SARS coronavirus main proteinase with HIV, psychotic and parasite drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2004**, 12, 2517–2521.
- (80) Webber, S. E.; Tikhe, J.; Worland, S. T.; Fuhrman, S. A.; Hendrickson, T. F.; Matthews, D. A.; Love, R. A.; Patick, A. K.; Meador, J. W.; Ferre, R. A.; Brown, E. L.; DeLisle, D. M.; Ford, C. E.; Binford, S. L. Design, synthesis, and evaluation of nonpeptidic inhibitors of human rhinovirus 3C protease. *J Med Chem* **1996**, 39, 5072-5082.
- (81) Shie, J.-J.; Fang, J.-M.; Kuo, C.-J.; Kuo, T.-H.; Liang, P.-H.; Huang, H.-J.; Yang, W.-B.; Lin, C.-H.; Chen, J.-L.; Wu, Y.-T.; Wong, C.-H. Discovery of potent anilide inhibitors against the severe acute respiratory syndrome 3CL protease. *J Med Chem* **2005**, 48, 4469-4473.
- (82) Chen, L.; Gui, C.; Luo, X.; Yang, Q.; Günther, S.; Scandella, E.; Drosten, C.; Bai, D.; He, X.; Ludewig, B.; Chen, J.; Luo, H.; Yang, Y.; Yang, Y.; Zou, J.; Thiel, V.; Chen, K.; Shen, J.; Shen, X.; Jiang, H. Cinanserin is an inhibitor of the 3C-like proteinase of severe acute respiratory syndrome coronavirus and strongly reduces virus replication in vitro. *J Virol* **2005**, 79, 7095-7103.
- (83) Kaeppler, U.; Stiefl, N.; Schiller, M.; Vicik, R.; Breuning, A.; Schmitz, W.; Rupprecht, D.; Schmuck, C.; Baumann, K.; Ziebuhr, J.; Schirmeister, T. A new lead for nonpeptidic active-site-directed inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease discovered by a combination of screening and docking methods. *J Med Chem* **2005**, 48, 6832-6842.
- (84) Stryer, L., **1990**, Biochemie, Spektrum-der-Wissenschaft-Verl.-Ges., Heidelberg, Deutschland
- (85) Gorbalenya, A. E.; Donchenko, A. P.; Blinov, V. M.; Koonin, E. V. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett* **1989**, 243, 103-114.

-
- (86) Appel, W. Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clin Biochem* **1986**, *19*, 317-322.
- (87) Copeland, Robert A. **2002** Enzymes. Wiley-Interscience. 2. ed., Hoboken, N.J., USA
- (88) Reymond, Jean-Louis. **2005** Enzyme assays. Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland
- (89) Atta-ur-Rahman; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J. **2001** Bioassay techniques for drug development. Harwood, Amsterdam, Niederlande
- (90) Bisswanger, Hans. **2008** Enzyme kinetics. Wiley-VCH. 2., rev. and updated ed., Weinheim, Deutschland
- (91) Smith, H. John; Simons, Claire. **2005** Enzymes and their inhibition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA
- (92) Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **1953**, *55*, 170-171.
- (93) Tian, W. X.; Tsou, C. L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028-1032.
- (94) Kitz, R.; Wilson, I. B. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **1962**, *237*, 3245-3249.
- (95) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* **1948**, *437*, 55–75.
- (96) Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **1978**, *47*, 819-846.
- (97) Lakowicz, Joseph R. **2006** Principles of fluorescence spectroscopy. Springer. 3rd., New York, USA
- (98) Grum-Tokars, V.; Ratia, K.; Begaye, A.; Baker, S. C.; Mesecar, A. D. Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: recommendations for standardized assays for drug discovery. *Virus Res* **2008**, *133*, 63-73.
- (99) Liu, Y.; Kati, W.; Chen, C. M.; Tripathi, R.; Molla, A.; Kohlbrenner, W. Use of a fluorescence plate reader for measuring kinetic parameters with inner filter effect correction. *Anal Biochem* **1999**, *267*, 331-335.
- (100) Ludewig, S.; Kossner, M.; Schiller, M.; Baumann, K.; Schirmeister, T. Enzyme kinetics and hit validation in fluorimetric protease assays. *Curr Top Med Chem* **2010**, *10*, 368-382.
- (101) McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem* **2002**, *45*, 1712-1722.

- (102) Seidler, J.; McGovern, S. L.; Doman, T. N.; Shoichet, B. K. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J Med Chem* **2003**, *46*, 4477-4486.
- (103) Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22*, 3099-3108.
- (104) Coan, K. E. D.; Maltby, D. A.; Burlingame, A. L.; Shoichet, B. K. Promiscuous aggregate-based inhibitors promote enzyme unfolding. *J Med Chem* **2009**, *52*, 2067-2075.
- (105) McGovern, S. L.; Helfand, B. T.; Feng, B.; Shoichet, B. K. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem* **2003**, *46*, 4265-4272.
- (106) Shoichet, B. K. Interpreting steep dose-response curves in early inhibitor discovery. *J Med Chem* **2006**, *49*, 7274-7277.
- (107) Shoichet, B. K. Screening in a spirit haunted world. *Drug Discov Today* **2006**, *11*, 607-615.
- (108) Jadhav, A.; Ferreira, R. S.; Klumpp, C.; Mott, B. T.; Austin, C. P.; Inglese, J.; Thomas, C. J.; Maloney, D. J.; Shoichet, B. K.; Simeonov, A. Quantitative analyses of aggregation, autofluorescence, and reactivity artifacts in a screen for inhibitors of a thiol protease. *J Med Chem* **2010**, *53*, 37-51.
- (109) Ryan, A. J.; Gray, N. M.; Lowe, P. N.; Chung, C.-w. Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J Med Chem* **2003**, *46*, 3448-3451.
- (110) Feng, B. Y.; Shoichet, B. K. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 550-553.
- (111) Coan, K. E. D.; Shoichet, B. K. Stability and equilibria of promiscuous aggregates in high protein milieus. *Mol Biosyst* **2007**, *3*, 208-213.
- (112) Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* **2005**, *57*, 787-796.
- (113) McGovern, S. L.; Shoichet, B. K. Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem* **2003**, *46*, 1478-1483.
- (114) Lineweaver, H.; Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* **1934**, *56*, 658-666.
- (115) Müller, R. H.; Schuhmann, R. **1996** Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- (116) Tech Note: Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. <http://www.malvern.de/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>.

- (117) Lu, I.-L.; Mahindroo, N.; Liang, P.-H.; Peng, Y.-H.; Kuo, C.-J.; Tsai, K.-C.; Hsieh, H.-P.; Chao, Y.-S.; Wu, S.-Y. Structure-based drug design and structural biology study of novel nonpeptide inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease. *J Med Chem* **2006**, *49*, 5154-5161.
- (118) Blanchard, J. E.; Elowe, N. H.; Huitema, C.; Fortin, P. D.; Cechetto, J. D.; Eltis, L. D.; Brown, E. D. High-throughput screening identifies inhibitors of the SARS coronavirus main proteinase. *Chem Biol* **2004**, *11*, 1445-1453.
- (119) Tsai, K.-C.; Chen, S.-Y.; Liang, P.-H.; Lu, I.-L.; Mahindroo, N.; Hsieh, H.-P.; Chao, Y.-S.; Liu, L.; Liu, D.; Lien, W.; Lin, T.-H.; Wu, S.-Y. Discovery of a novel family of SARS-CoV protease inhibitors by virtual screening and 3D-QSAR studies. *J Med Chem* **2006**, *49*, 3485-3495.
- (120) Kao, R. Y.; To, A. P. C.; Ng, L. W. Y.; Tsui, W. H. W.; Lee, T. S. W.; Tsoi, H.-W.; Yuen, K.-Y. Characterization of SARS-CoV main protease and identification of biologically active small molecule inhibitors using a continuous fluorescence-based assay. *FEBS Lett* **2004**, *576*, 325-330.
- (121) Kao, R. Y.; Wayne H W Tsui; Terri S W Lee; Tanner, J. A.; Watt, R. M.; Huang, J.-D.; Hu, L.; Chen, G.; Chen, Z.; Zhang, L.; He, T.; Chan, K.-H.; Tse, H.; Amanda P C To; Louisa W Y Ng; Bonnie C W Wong; Tsoi, H.-W.; Yang, D.; Ho, D. D.; Yuen, K.-Y. Identification of novel small-molecule inhibitors of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus by chemical genetics. *Chem Biol* **2004**, *11*, 1293-1299.
- (122) Mukherjee, P.; Desai, P.; Ross, L.; White, E. L.; Avery, M. A. Structure-based virtual screening against SARS-3CL(pro) to identify novel non-peptidic hits. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 4138-4149.
- (123) Mukherjee, P.; Shah, F.; Desai, P.; Avery, M. Inhibitors of SARS-3CL(pro): Virtual Screening, Biological Evaluation, and Molecular Dynamics Simulation Studies. *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 1376-1392.
- (124) Liu, Z.; Huang, C.; Fan, K.; Wei, P.; Chen, H.; Liu, S.; Pei, J.; Shi, L.; Li, B.; Yang, K.; Liu, Y.; Lai, L. Virtual screening of novel noncovalent inhibitors for SARS-CoV 3C-like proteinase. *J Chem Inf Model* **2005**, *45*, 10-17.
- (125) Gietzen, K.; Wüthrich, A.; Bader, H. R 24571: a new powerful inhibitor of red blood cell Ca⁺⁺-transport ATPase and of calmodulin-regulated functions. *Biochem Biophys Res Commun* **1981**, *101*, 418-425.
- (126) Gietzen, K.; Sadorf, I.; Bader, H. A model for the regulation of the calmodulin-dependent enzymes erythrocyte Ca²⁺-transport ATPase and brain phosphodiesterase by activators and inhibitors. *Biochem J* **1982**, *207*, 541-548.

- (127) Liu, Y.-C.; Huang, V.; Chao, T.-C.; Hsiao, C.-D.; Lin, A.; Chang, M.-F.; Chow, L.-P. Screening of drugs by FRET analysis identifies inhibitors of SARS-CoV 3CL protease. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 333, 194-199.
- (128) Wu, C.-J.; Jan, J.-T.; Chen, C.-M.; Hsieh, H.-P.; Hwang, D.-R.; Liu, H.-W.; Liu, C.-Y.; Huang, H.-W.; Chen, S.-C.; Hong, C.-F.; Lin, R.-K.; Chao, Y.-S.; John T A Hsu Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication by niclosamide. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48, 2693-2696.
- (129) Medvedev, A.; Buneeva, O.; Glover, V. Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics* **2007**, 1, 151-162.
- (130) Jungheim, L. Inhibition of human rhinovirus 3C protease by homophthalimides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, 7, 1589–1594.
- (131) Lee, D.; Long, S. A.; Adams, J. L.; Chan, G.; Vaidya, K. S.; Francis, T. A.; Kikly, K.; Winkler, J. D.; Sung, C. M.; Debouck, C.; Richardson, S.; Levy, M. A.; DeWolf, W. E.; Keller, P. M.; Tomaszek, T.; Head, M. S.; Ryan, M. D.; Haltiwanger, R. C.; Liang, P. H.; Janson, C. A.; McDevitt, P. J.; Johanson, K.; Concha, N. O.; Chan, W.; Abdel-Meguid, S. S.; Badger, A. M.; Lark, M. W.; Nadeau, D. P.; Suva, L. J.; Gowen, M.; Nuttall, M. E. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem* **2000**, 275, 16007-16014.
- (132) Chen, L.-R.; Wang, Y.-C.; Lin, Y. W.; Chou, S.-Y.; Chen, S.-F.; Liu, L. T.; Wu, Y.-T.; Kuo, C.-J.; Chen, T. S.-S.; Juang, S.-H. Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, 15, 3058-3062.
- (133) Zhou, L.; Liu, Y.; Zhang, W.; Wei, P.; Huang, C.; Pei, J.; Yuan, Y.; Lai, L. Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors. *J Med Chem* **2006**, 49, 3440-3443.
- (134) Yang, Q.; Chen, L.; He, X.; Gao, Z.; Shen, X.; Bai, D. Design and synthesis of cinanserin analogs as severe acute respiratory syndrome coronavirus 3CL protease inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2008**, 56, 1400-1405.
- (135) Hsu, J. T.-A.; Kuo, C.-J.; Hsieh, H.-P.; Wang, Y.-C.; Huang, K.-K.; Lin, C. P.-C.; Huang, P.-F.; Chen, X.; Liang, P.-H. Evaluation of metal-conjugated compounds as inhibitors of 3CL protease of SARS-CoV. *FEBS letters* **2004**, 574, 116–120.
- (136) Kocholaty, W.; Weil, L.; Smith, L. Proteinase secretion and growth of *Clostridium histolyticum*. *Biochem J* **1938**, 32, 1685-1690.
- (137) Mitchell, W. M.; Harrington, W. F. [45] Clostripain. *Methods in Enzymology* **1970**, 19, 635–642.

- (138) Olge, J. D.; Tytell, A. A. The activity of *Clostridium histolyticum* proteinase on synthetic substrates. *Arch Biochem Biophys* **1953**, *42*, 327-336.
- (139) Ullmann, D.; Jakubke, H. D. The specificity of clostripain from *Clostridium histolyticum*. Mapping the S' subsites via acyl transfer to amino acid amides and peptides. *Eur J Biochem* **1994**, *223*, 865-872.
- (140) Gusman, H.; Grogan, J.; Kagan, H. M.; Troxler, R. F.; Oppenheim, F. G. Salivary histatin 5 is a potent competitive inhibitor of the cysteine proteinase clostripain. *FEBS Lett* **2001**, *489*, 97-100.
- (141) Mitchell, W. M.; Harrington, W. F. Purification and properties of clostridiopeptidase B (Clostripain). *J Biol Chem* **1968**, *243*, 4683-4692.
- (142) Kembhavi, A. A.; Buttle, D. J.; Rauber, P.; Barrett, A. J. Clostripain: characterization of the active site. *FEBS Lett* **1991**, *283*, 277-280.
- (143) Schirmeister, T.; Peric, M. Aziridiny peptides as inhibitors of cysteine proteases: effect of a free carboxylic acid function on inhibition. *Bioorg Med Chem* **2000**, *8*, 1281-1291.
- (144) Mares-Guia, M.; Shaw, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *J Biol Chem* **1965**, *240*, 1579-1585.
- (145) Porter, W. H.; Cunningham, L. W.; Mitchell, W. M. Studies on the active site of clostripain. The specific inactivation by the chloromethyl ketone derived from -N-tosyl-L-lysine. *J Biol Chem* **1971**, *246*, 7675-7682.
- (146) Siffert, O.; Emöd, I.; Keil, B. Interaction of clostripain with natural trypsin inhibitors and its affinity labeling by N α -p-nitrobenzyloxycarbonyl arginine chloromethyl ketone. *FEBS Lett* **1976**, *66*, 114-119.
- (147) Sorimachi, H.; Ishiura, S.; Suzuki, K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **1997**, *328* (Pt 3), 721-732.
- (148) Dutt, P.; Spriggs, C. N.; Davies, P. L.; Jia, Z.; Elce, J. S. Origins of the difference in Ca²⁺ requirement for activation of μ - and m-calpain. *Biochem J* **2002**, *367*, 263-269.
- (149) Pietsch, M.; Krystle C H Chua; Abell, A. D. Calpains: attractive targets for the development of synthetic inhibitors. *Curr Top Med Chem* **2010**, *10*, 270-293.
- (150) Chang, A.; Schomburg, D.; Schomburg, I. Springer handbook of enzymes. **2009**. 2. ed. Springer, Berlin, Deutschland
- (151) Cuerrier, D.; Moldoveanu, T.; Davies, P. L. Determination of peptide substrate specificity for μ -calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 40632-40641.

- (152) Murachi, T.; Tanaka, K.; Hatanaka, M.; Murakami, T. Intracellular Ca^{2+} -dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul* **1980**, *19*, 407-424.
- (153) Suzuki, K.; Imajoh, S.; Emori, Y.; Kawasaki, H.; Minami, Y.; Ohno, S. Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett* **1987**, *220*, 271-277.
- (154) Donkor, I. O.; Korukonda, R.; Huang, T. L.; LeCour, L. Peptidyl aldehyde inhibitors of calpain incorporating P2-proline mimetics. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13*, 783-784.
- (155) Donkor, I. O.; Han, J.; Zheng, X. Design, synthesis, molecular modeling studies, and calpain inhibitory activity of novel alpha-ketoamides incorporating polar residues at the P1'-position. *J Med Chem* **2004**, *47*, 72-79.
- (156) Donkor, I. O.; Korukonda, R. Synthesis and calpain inhibitory activity of peptidomimetic compounds with constrained amino acids at the P2 position. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 4806-4808.
- (157) Persönliches Gespräch mit Dr. Markus Pietsch, Institut für Pharmakologie, Uniklinik Köln
- (158) O'Brien, T.; Lee, D. Prospects for caspase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* **2004**, *4*, 153-165.
- (159) Riedl, S. J.; Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 405-413.
- (160) Thornberry, N. A. Interleukin-1 beta converting enzyme. *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 615-631.
- (161) Thornberry, N. A. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* **1997**, *53*, 478-490.
- (162) Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; K. T. Chapman and A. D. Howard; Kostura, M. J.; Miller, D. K.; S. M. Molineaux and J. R. Weidner; Aunins, J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **1992**, *356*, 768-774.

Anhang

Zu Kapitel 3:

Tabelle A.3.1: K_m -Werte von verwendeten Substraten

Substrat	K_m -Wert
Z-Phe-Arg-AMC * HCl	(an Cathepsin B) 153,3/ 178,7/ 102,5/ 140,5/ 195,2/ 156,0/ 132,2/ 126,7
Abz-Ser-Val-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly- (NO₂)Tyr-Arg-(MTS),TFA	(an SARS-CoV M ^{pro}) 171,9/ 195,2/ 180,1/ 200,4/ 209,6/ 203,1

Zu Kapitel 4:

Tabelle A.4.2: Vergleich der Inhibitionswerte[%] zum einen ohne und zum anderen mit Zusatz von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,01%

	Miconazolnitrat [20 µM]	Miconazolnitrat [100 µM]
Inhibition [%] ohne Zusatz von Triton X-100	94,7 94,7	98,9 99,2
Inhibition [%] unter Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	15,4 20,9	17,8 17,7

Tabelle A.4.3: Vergleich der Inhibitionswerte[%] zum einen ohne und zum anderen mit Zusatz von BSA in einer Endkonzentration von 0,1%

	Miconazolnitrat [20 µM]	Miconazolnitrat [100 µM]
Inhibition [%] ohne Zusatz von BSA	75,5 76,6	98,7 99,1
Inhibition [%] unter Zusatz von BSA (0,1%)	12,1 k.l.	k.l. 3,5

Zu Kapitel 5:**Tabelle A.5.2: Messen der Inhibition der verschiedenen Testsubstanzen bei einer Konzentration von 20 μM**

Inhibition in Prozent [%] bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM					
Substanz	Ohne Korrektur	Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von Triton X-100 (0,01%) und Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von DTT (700 μM)
1	99,4	99,4	91,9	92,0	13,5
	99,3	99,3	93,0	93,0	8,6
	99,0	99,0	93,3	93,0	20,6
	99,2	99,2	96,2	96,0	19,2
2	29,1	25,6	1,5	k.l.	20,6
	30,0	26,5	6,1	1,39	20,1
	21,5	24,3	2,83	5,24	18,5
	22,6	23,3	6,16	8,48	25,1
	17,7	20,2	9,68	11,9	12,9
3	43,5	44,3	k.l.	k.l.	53,6
	46,5	47,2	2,2	3,48	56,5
	34,9	36,4	4,7	6,91	22,5
	39,4	40,8	7,2	9,36	28,4
4	34,3	24,0	22,8	10,7	24,4
	27,0	15,7	17,0	4,11	23,7
	28,2	25,5	11,6	8,23	9,3
	31,9	29,3	9,3	5,85	14,7
5	39,1	49,9	55,5	56,2	14,2
	37,1	38,0	56,1	56,7	12,9
	21,7	15,4	12,5	5,39	9,56
	31,9	17,9	15,4	8,56	9,75

Inhibition in Prozent [%] bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μ M

Substanz	Ohne Korrektur	Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von Triton X-100 (0,01%) und Korrektur mit f_{corr}	Zusatz von DTT (700 μ M)
6	16,9	23,5	9,3	16,6	5,1
	16,9	23,5	18,5	25,0	13,8
	6,8	2,46	4,34	k.l.	3,99
	9,56	5,35	10,1	5,96	3,81
7	21,8	Fluoreszenz	k.l.	Fluoreszenz	18,1
	20,6		k.l.		21,7
	11,8		k.l.		10,3
	11,6		k.l.		11,1
8	78,3	80,1	13,5	20,5	76,8
	79,2	80,9	12,6	19,7	81,0
	65,6	69,8	15,4	26,0	56,4
	70,5	74,2	15,3	25,8	54,1
9	19,4	16,2	17,9	14,6	24,3
	14,7	11,4	17,9	14,7	16,7
	22,2	21,8	6,41	5,92	26,0
	20,7	20,3	8,80	8,32	24,6
10	29,1	23,9	3,4	k.l.	35,2
	31,7	26,7	0,7	k.l.	26,7
	22,6	14,8	k.l.	k.l.	15,6
	33,6	26,8	5,46	k.l.	22,6
11	94,7	94,4	93,3	92,9	70,4
	95,3	95,0	93,6	93,2	66,9
12	26,9 ¹⁾	7,56 ^{1),2)}	21,3 ¹⁾	0,475 ^{1),2)}	24,7 ¹⁾
	25,8 ¹⁾	6,13 ^{1),2)}	20,4 ¹⁾	k.l. ^{1),2)}	22,3 ¹⁾

¹⁾Inhibition [%] bei einer Konzentration von 100 μ M²⁾Abz = 4 μ M

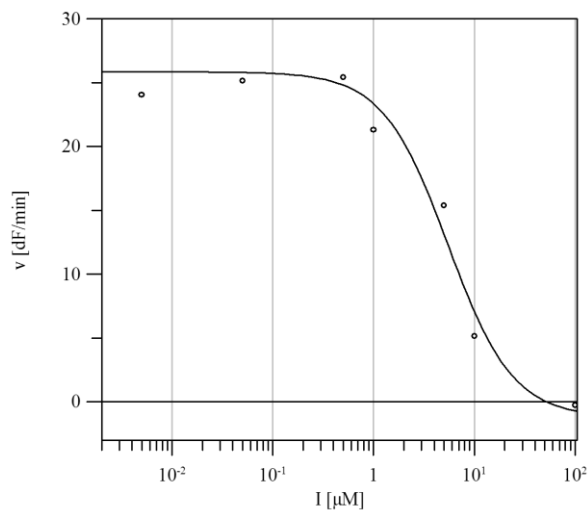
Tabelle A.5.3: IC₅₀-Werte der Testsubstanzen

IC ₅₀ - Werte [µM]				
Testsubstanz	Ohne Korrektur	Korrektur mit f _{corr}	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von Triton X-100 (0,01%) und Korrektur mit f _{corr}
1	5,14	4,95	8,12	8,15
	5,46	5,29	6,27	6,16
2	38,2	38,9	208,3	116,1
	51,3	52,9	425,8	412,0
	70,6	75,4		
3	16,2	15,7	103,7	95,5
	16,4	15,6	99,0	82,1
	17,0	16,2		
4	50,2	55,7	635,4	Keine Kurve möglich
	48,7	61,1	228,1	
5	17,5	17,9	19,7	23,1
	18,3	18,9	18,1	19,6
6	131,2	167,3	365,4	544,7
	134,6	159,8	391,1	410,6
7	37,6	Fluoreszenz	353,0	Fluoreszenz
	40,5		305,9	
8	16,7	---	78,7	---
	18,0		61,5	
9	63,1	65,2	75,6	79,3
	58,6	61,1	75,5	79,1
10	39,9	43,7	84,8	Keine Kurve möglich
	30,0	32,8	129,3	
11		0,375	0,486	0,420
		0,411	0,476	0,416
12	471,5	--	--	
	446,4			

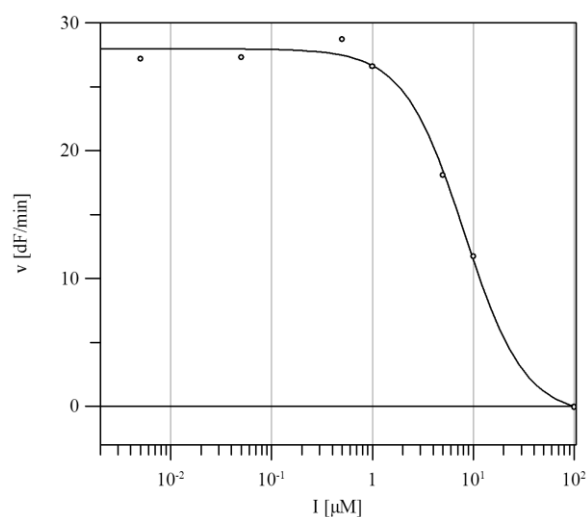
IC₅₀-Werte gemessen an der SARS-CoV M^{pro}:

Die erste Abbildung gibt dabei jeweils den IC₅₀-Wert ohne Korrektur wieder. Die zweite Kurve stellt jeweils den IC₅₀-Wert nach Triton X-100 Zugabe dar.

Substanz 1:

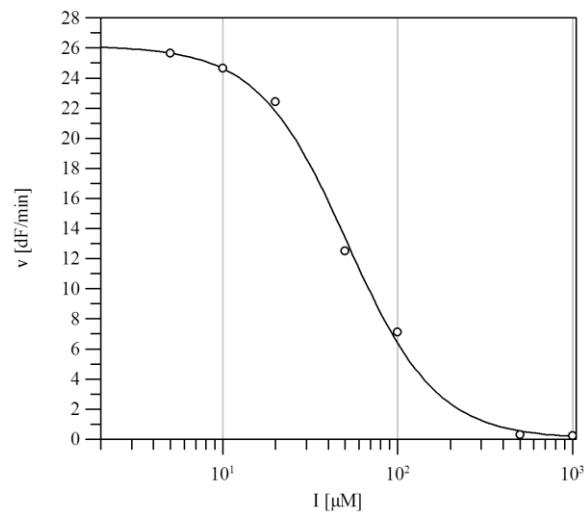


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	27,0684	3,6800
IC 50	5,4627	1,6920
Slope factor	1,3500	0,5344
Background	-1,2271	3,1347

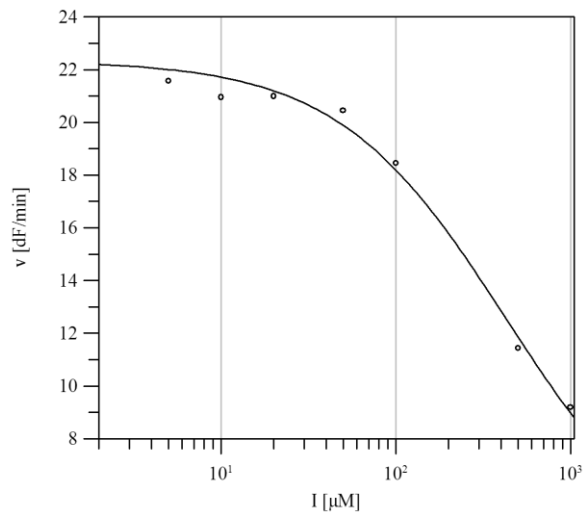


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	28,6949	1,2746
IC 50	8,1194	0,7501
Slope factor	1,4504	0,2415
Background	-0,7315	1,1053

Substanz 2:

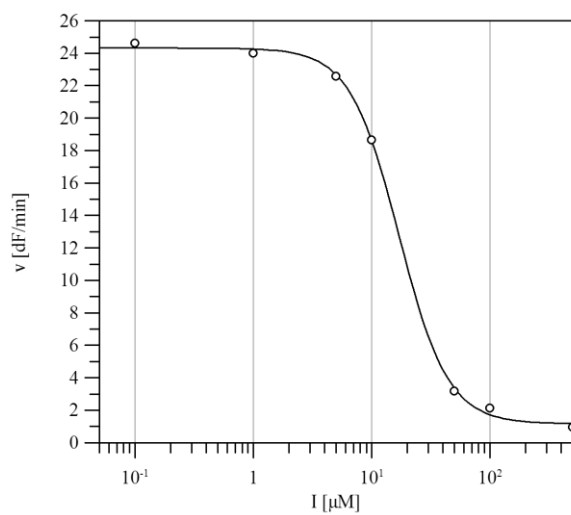


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	26,1210	0,8127
IC 50	51,3325	3,1581
Slope factor	1,7040	0,1727
Background	0,0191	0,5506

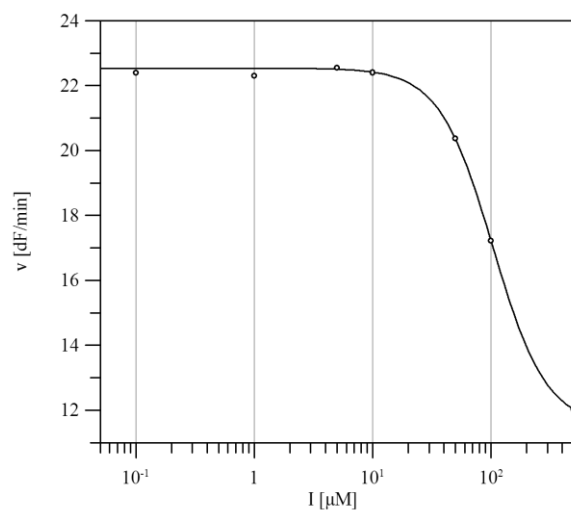


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	19,5558	8,1535
IC 50	425,7991	440,5571
Slope factor	0,9051	0,2880
Background	2,7928	7,8624

Substanz 3:

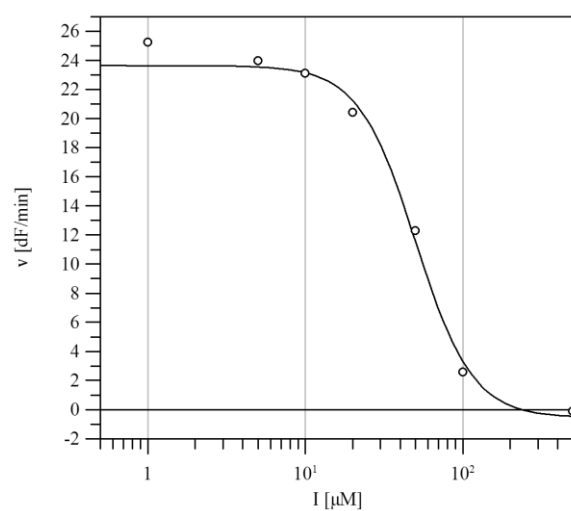


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	23,1517	0,3420
IC 50	16,9957	0,7831
Slope factor	2,0964	0,1264
Background	1,1716	0,2734

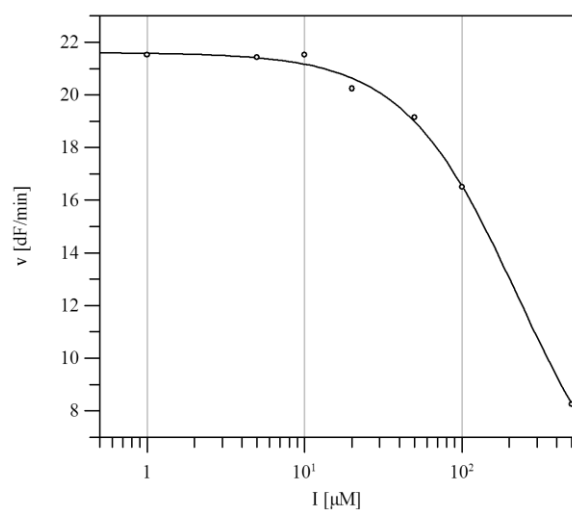


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	11,0286	0,4304
IC 50	103,7202	7,3909
Slope factor	1,9205	0,2590
Background	11,5142	0,3953

Substanz 4:

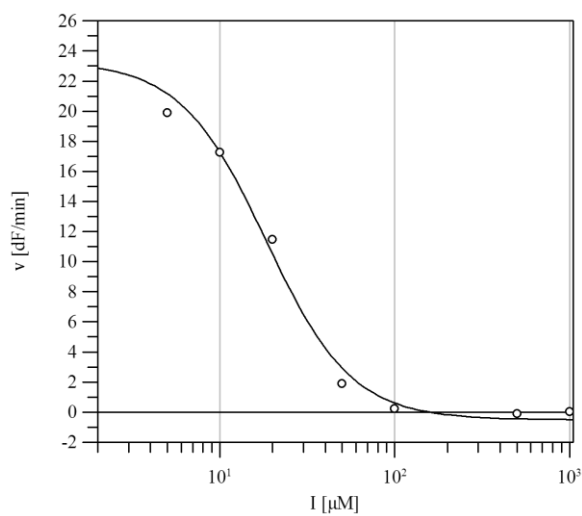


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	24,2165	1,5964
IC 50	50,1581	5,1815
Slope factor	2,3972	0,5023
Background	-0,5651	1,3411

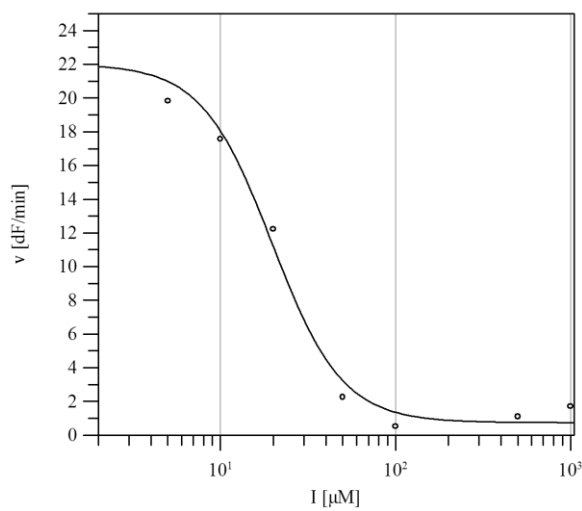


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	18,5791	3,3651
IC 50	228,0603	84,2091
Slope factor	1,1923	0,2131
Background	3,0221	3,2622

Substanz 5:

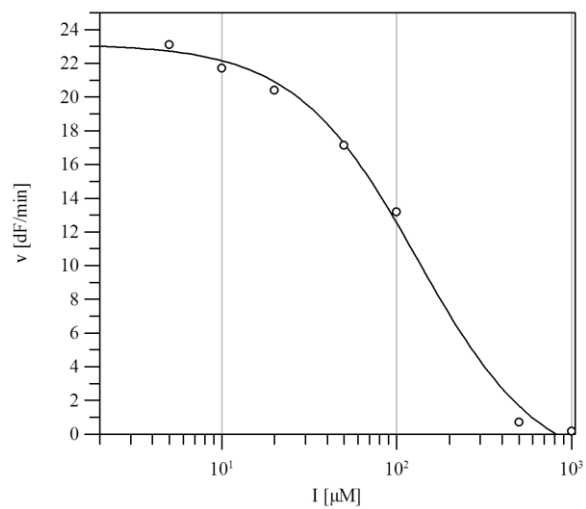


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	23,8430	1,3187
IC 50	18,3349	1,9779
Slope factor	1,7730	0,2881
Background	-0,5219	0,7285

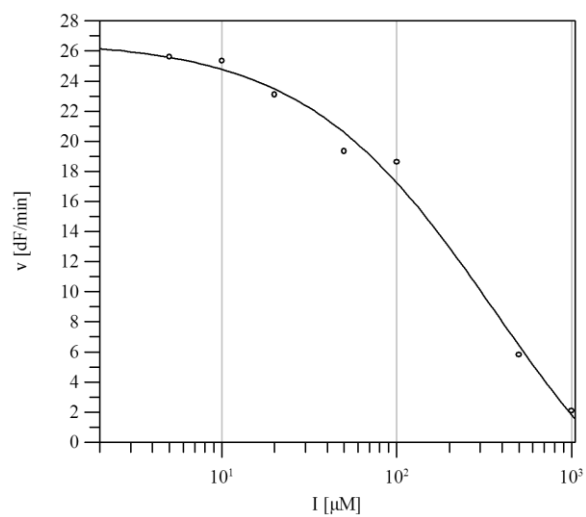


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	21,2738	1,4468
IC 50	19,7156	2,3080
Slope factor	2,1706	0,4838
Background	0,7442	0,8025

Substanz 6:

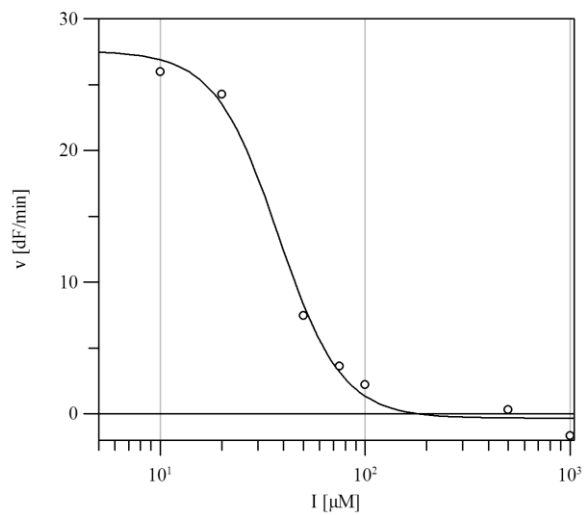


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	25,5416	2,2019
IC 50	131,1986	25,2422
Slope factor	1,2432	0,2211
Background	-2,3861	1,8606

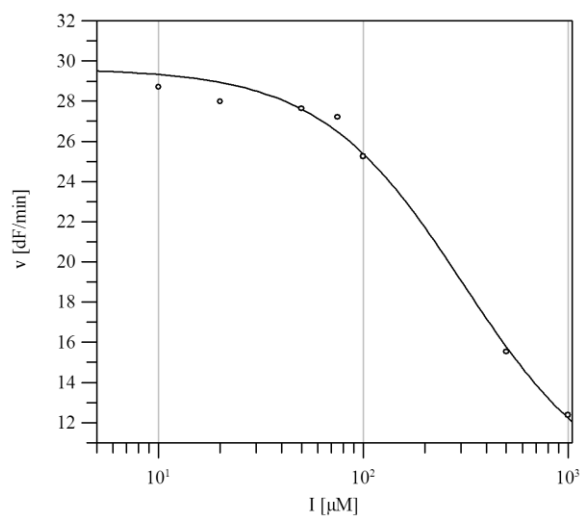


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	36,0648	10,3068
IC 50	365,3834	275,3553
Slope factor	0,7976	0,2011
Background	-9,3596	9,8370

Substanz 7:

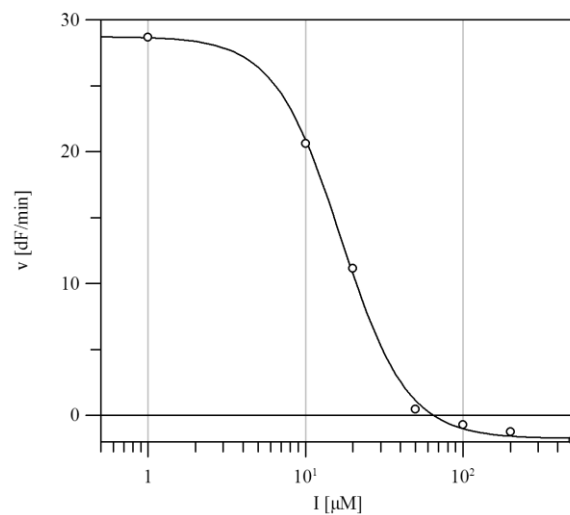


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	27,8840	1,2797
IC 50	37,5661	2,9338
Slope factor	2,8078	0,4091
Background	-0,3333	0,7700

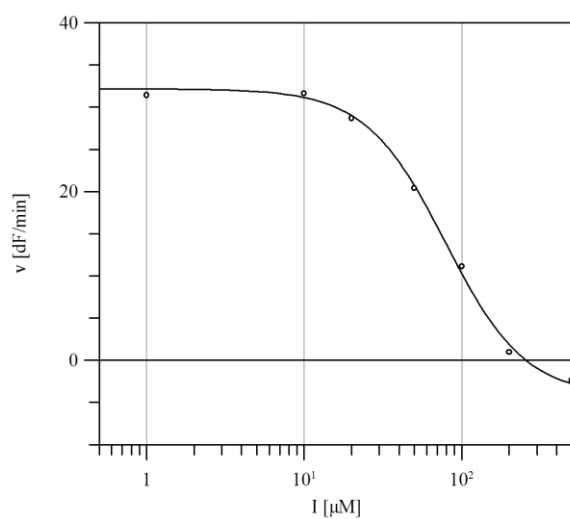


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	21,3498	4,5452
IC 50	305,8774	135,5638
Slope factor	1,2483	0,3082
Background	8,2746	4,2789

Substanz 8:

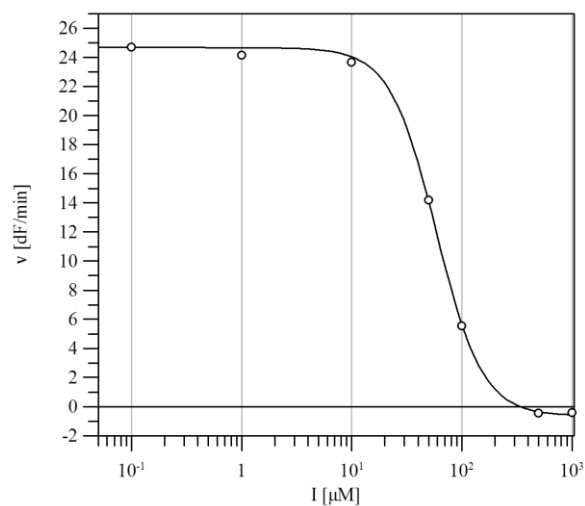


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	30,4843	0,4762
IC 50	16,7391	0,5016
Slope factor	2,0620	0,1269
Background	-1,7556	0,3076

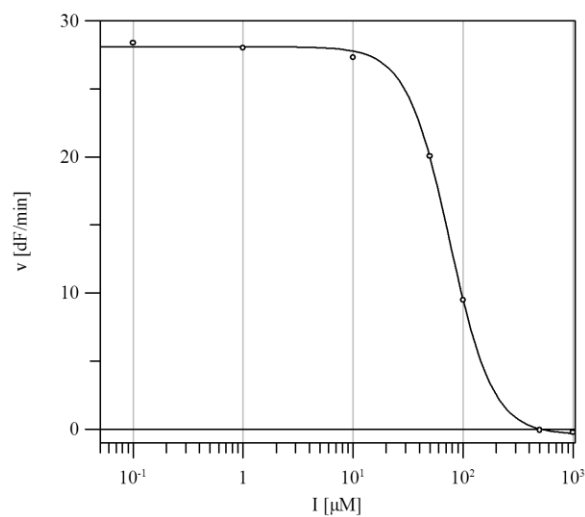


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	36,4221	1,4873
IC 50	78,7356	5,2295
Slope factor	1,7156	0,1750
Background	-4,2429	1,2517

Substanz 9:

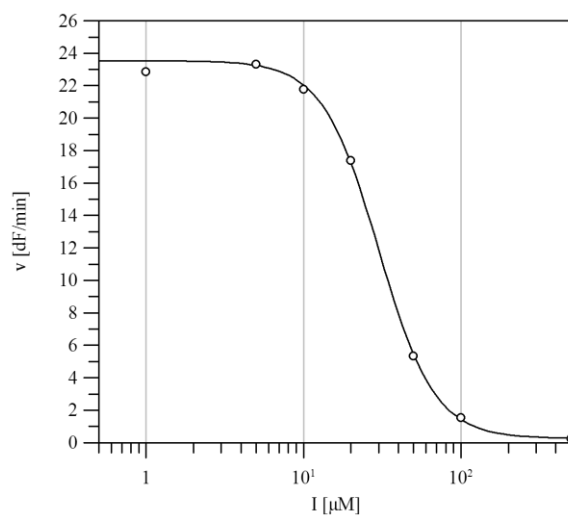


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	25,3156	0,5347
IC 50	58,5740	2,4430
Slope factor	2,0740	0,2145
Background	-0,6393	0,4264

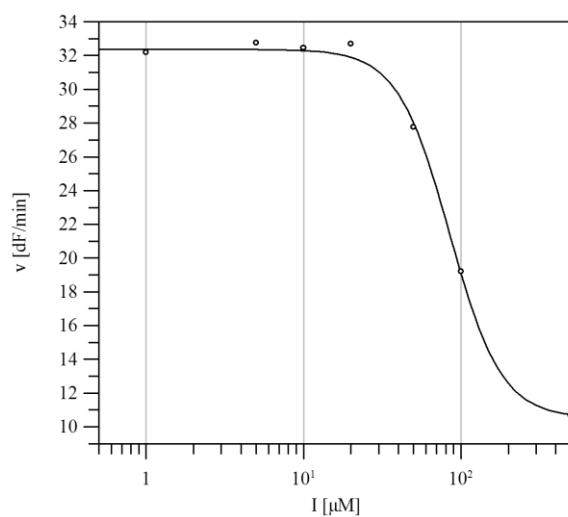


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	28,5004	0,2991
IC 50	75,5922	1,4838
Slope factor	2,2267	0,1095
Background	-0,4082	0,2429

Substanz 10:

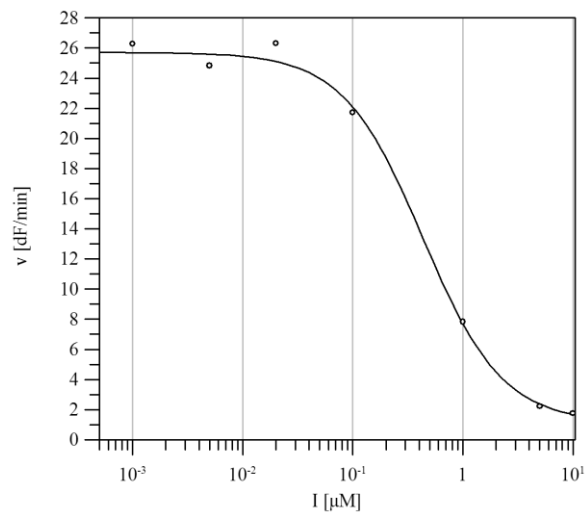


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	23,2825	0,6061
IC 50	30,0153	1,4194
Slope factor	2,4381	0,1998
Background	0,2618	0,4806

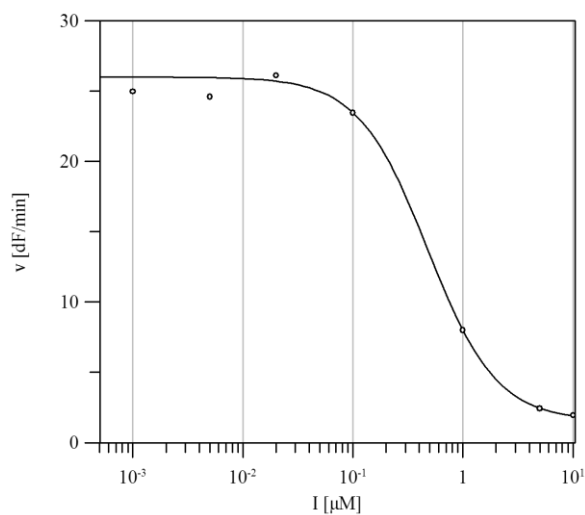


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	21,8471	0,8318
IC 50	84,8045	4,5280
Slope factor	2,6358	0,3677
Background	10,5226	0,7413

Substanz 11:

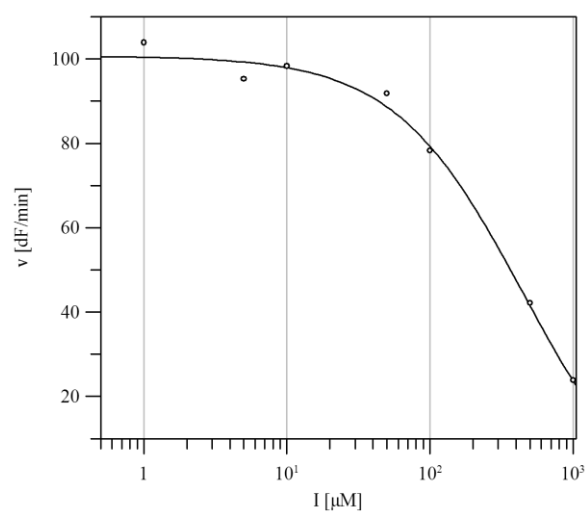


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	24,5838	1,0977
IC 50	0,4316	0,0731
Slope factor	1,1982	0,1777
Background	1,1229	0,9052



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	24,4575	1,5500
IC 50	0,4760	0,1138
Slope factor	1,3847	0,3281
Background	1,5467	1,2669

Substanz 12:

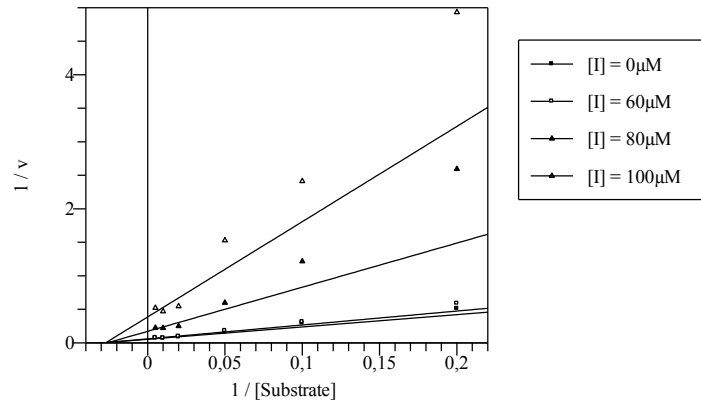


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	112,4622	40,8245
IC 50	446,3550	440,6242
Slope factor	0,9661	0,2047
Background	-11,7280	40,0543

Michaelis-Menten Kinetik: Lineweaver Burk Darstellung:

Unter den Diagrammen sind die Ergebnisse der Messungen an der SARS-CoV M^{pro} dargestellt, beginnend mit den Werten für die niedrigste Inhibitorkonzentration von links nach rechts.

Substanz 2:



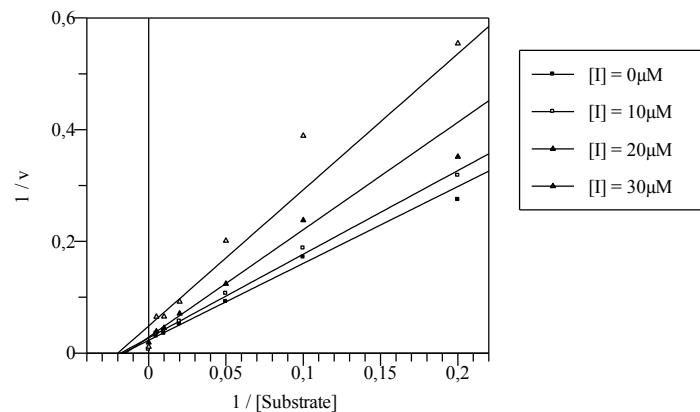
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	18,4949	1,5690
Km	33,8225	8,6044

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	5,8467	0,7183
Km	38,4924	13,1855

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	17,0515	1,4531
Km	35,3980	8,9311

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	2,5945	0,4103
Km	36,8721	16,9727

Substanz 3:



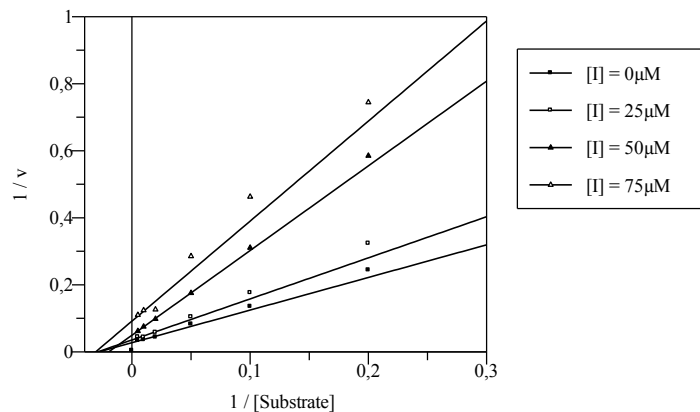
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	43,5734	1,5784
Km	59,9514	5,4490

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	35,0663	1,7804
Km	67,4462	8,2601

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	36,8511	0,9824
Km	55,1989	3,7891

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	20,6254	2,0097
Km	50,2648	13,0593

Substanz 4:



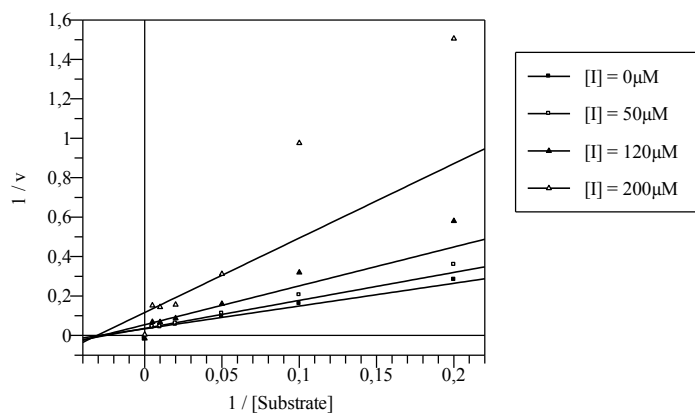
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	37,0389	1,6277
Km	36,0680	4,6604

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	20,2474	0,2137
Km	51,1649	1,4251

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	28,4216	1,9057
Km	34,8336	6,9493

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	10,9534	0,9956
Km	32,6955	9,0162

Substanz 6:



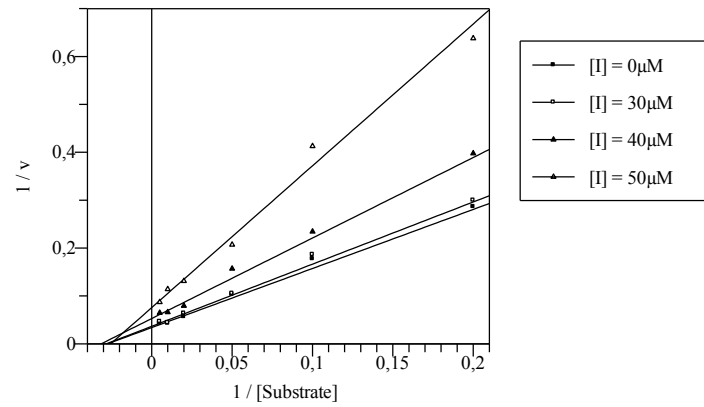
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	29,7856	1,3671
Km	34,3387	4,6350

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	18,5233	1,3816
Km	36,5187	7,9484

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	28,1093	1,4421
Km	39,8990	5,8468

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	8,6276	1,1328
Km	32,5813	12,6436

Substanz 7:



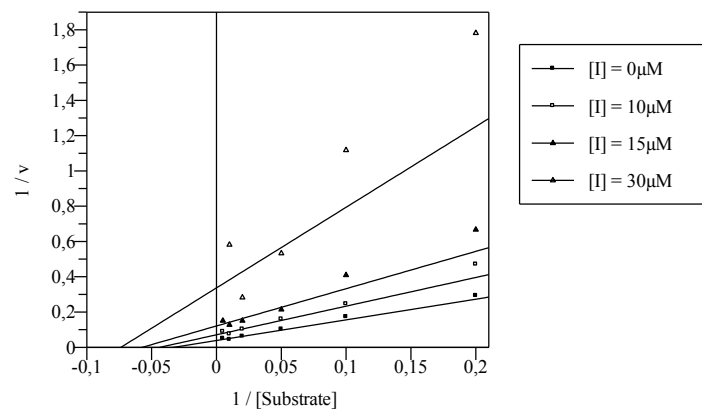
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	29,5518	1,8972
Km	36,4648	6,7518

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	18,9509	1,2548
Km	31,8644	6,3266

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	27,4000	2,2372
Km	35,5779	8,4560

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	13,2288	0,7712
Km	39,1763	6,5480

Substanz 8:



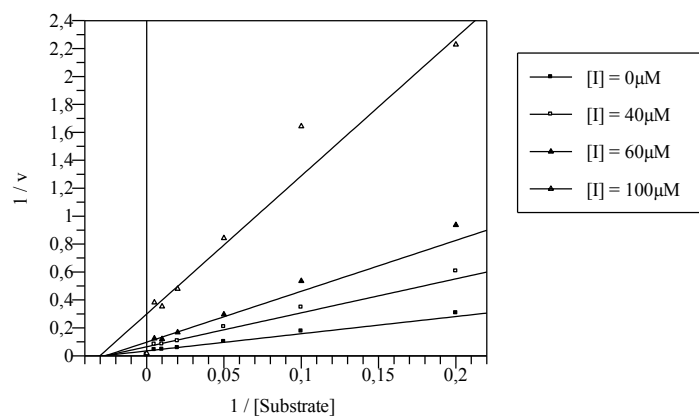
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	25,8169	2,4616
Km	30,2476	8,9249

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	8,2707	0,7793
Km	17,4857	5,8934

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	14,1155	1,4359
Km	22,9382	7,7853

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	2,9694	1,1946
Km	13,5714	17,4450

Substanz 9:



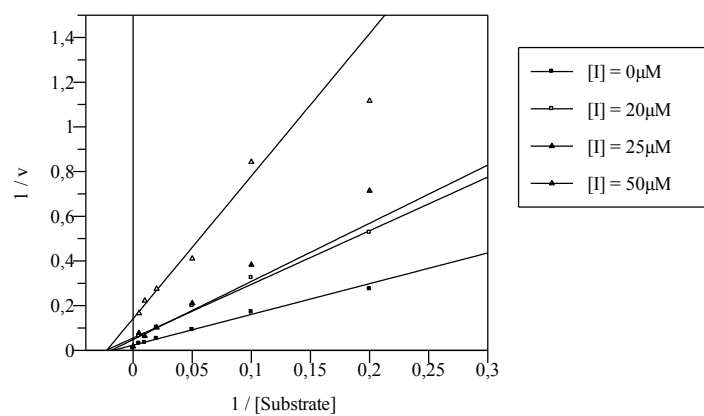
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	28,7987	1,2245
Km	35,4846	4,4571

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	10,2648	0,7928
Km	37,3984	8,4205

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	15,5015	1,0065
Km	37,6953	7,1161

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	3,3445	0,2853
Km	33,0748	8,5268

Substanz 10:

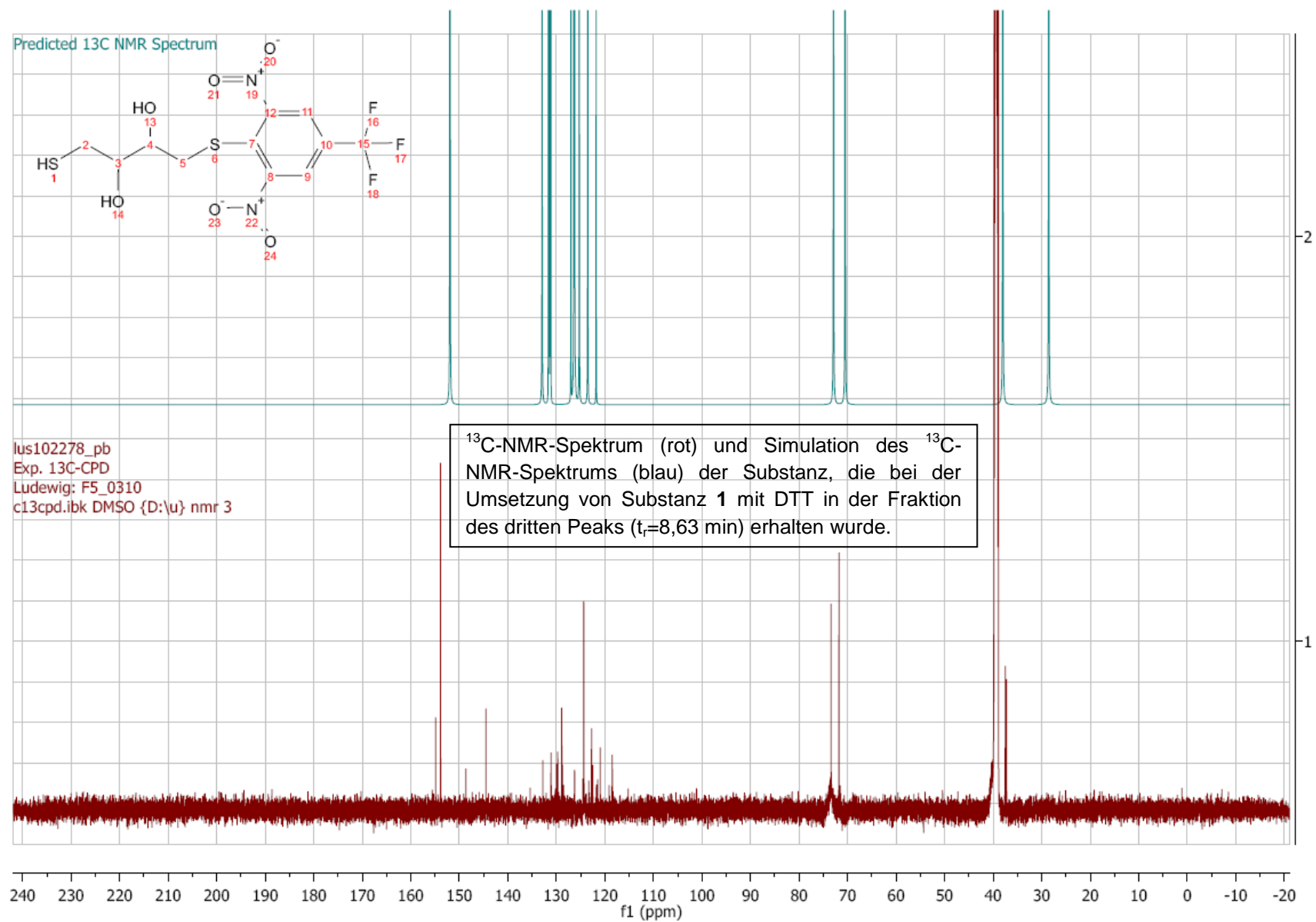


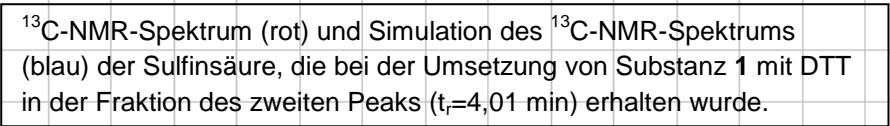
Parameter	Value	Std. Error
Vmax	43,5734	1,5784
Km	59,9514	5,4490

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	18,2122	2,9726
Km	43,7198	19,9391

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	20,9120	1,5073
Km	54,4348	10,1347

Parameter	Value	Std. Error
Vmax	7,0611	0,4355
Km	45,0368	7,5522





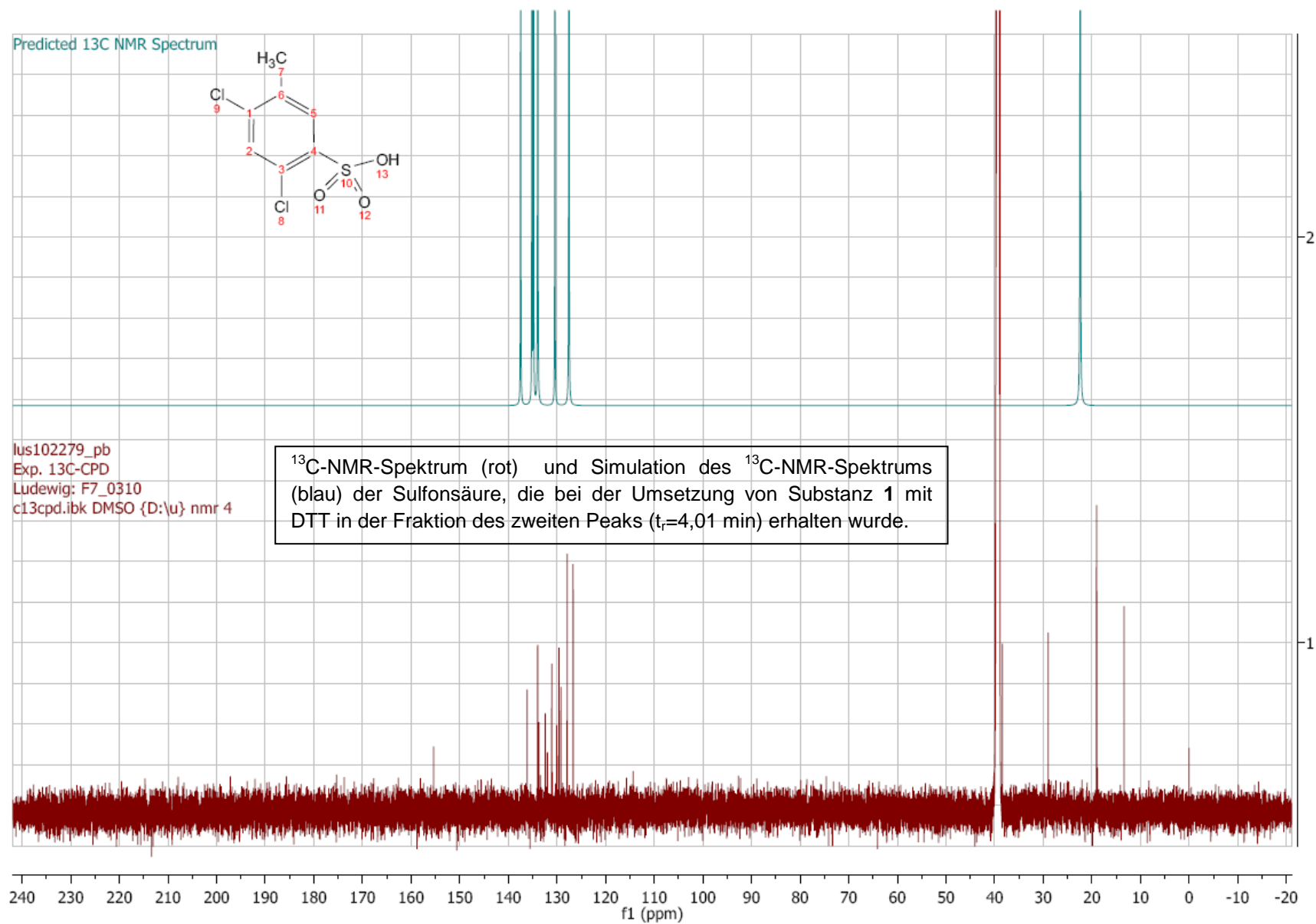


Tabelle A.5.4: Testung aggregierender Substanzen in einer Konzentration von 100 µM am Cathepsin B

Substanz (100 µM)	Inhibition [%] (Testung an CathB) ¹⁾
1	104,1/ 109,4/ 104,6/ 106,4
2	65,1/ 57,0/ 64,1/ 54,2
3	70,3/ 77,3/ 65,1/ 78,3
4	50,5/ 47,0
5	k.l. ²⁾
6	40,1/ 39,2
7	74,8/ 77,2

Tabelle A.5.6: Ergebnisse der Testungen weiterer Diarylsulfone an der SARS-CoV M^{pro}

Inhibitor	Prozent Inhibition [%]	Unter DTT-Zusatz [%]
13	54,0/ 48,4 (100 µM) keine Inhibition (20 µM)	16,6/ 19,0 (100 µM) 4,1/ 5,0 (20 µM)
14	26,8/ 30,2 (100 µM) 3,9/ 6,0 (20 µM)	23,8/ 27,5 (100 µM) 2,9/ 2,5 (20 µM)
15	83,9/ 85,7 (100 µM) 46,6/ 45,7 (20 µM)	36,0/ 38,2 (100 µM) 9,6/ 7,4 (20 µM)
16	48,8/ 45,9 (100 µM) 10,0/ 12,3 (20 µM)	10,2/ 17,3 (100 µM) k.l./ k.l. (20 µM)
17	24,4/ 23,5 (100 µM) 30,7/ 25,4 (20 µM)	15,5/ 16,5 (100 µM) k.l. (20 µM)
18	4,7/ 8,5 (100 µM) 13,5/ 11,2 (20 µM)	0,5/ k.l. (100 µM) k.l./ k.l. (20 µM)
19	72,1/ 68,3/ 78,3/ 74,8 (100 µM)	58,5/ 56,4 (100 µM)

Inkubationstest mit Hexachlorophen an der SARS-CoV M^{pro} nach dem Assayprotokoll mit einem DMSO-Gehalt von 1,75%:

Inkubation (min)	Inhibition [%] bei einer Hexachlorophenkonzentration von 10 µM
0	77,3
	78,1
	79,5
	77,2
30	74,5
	77,0
	84,8
	84,3
60	109,6
	97,8
	88,7
	86,3

Tabelle A.5.7: Änderung der Inhibitionswerte von Substanz 2 an der SARS-CoV M^{pro} durch Zusatz von Triton X-100 sowie BSA

Substanz	% Inhibition bei [I] = 100 µM	Zusatz von Triton X-100 (0,01%)	Zusatz von BSA (0,1%)
2	77,1	5,9	54,2
	84,5	7,8	50,5

Tabelle A.5.8: Bestimmung der Selektivität von Substanz 20 und 21

Substanz	IC ₅₀ -Werte [µM]	% Inhibition bei [I] = 100 µM im SARS-CoV M ^{pro} -Assay	% Inhibition bei [I] = 100 µM unter Zusatz von DTT (700µM)	% Inhibition bei [I] = 100 µM im Cathepsin B-Assay
20	0,111	99,0	99,9	2,3
	0,0969			2,8
	0,111			3,9
	0,111			ni
21	3,91	99,7	62,0	Außerhalb des
	4,25	99,3	55,7	Fluoreszenzbereichs

Zu Kapitel 6:**Tabelle A.6.2: Messung von verschiedenen E-64-Konzentrationen an Clostripain bei einem DMSO-Anteil von 4%**

Inhibitorkonzentration (E-64) [μM]	Prozent Inhibition [%]
0,2	keine Inhibition
	4,7
2	11,4
	20,4
20	63,3
	66,4

Tabelle A.6.3: Messung von verschiedenen E-64-Konzentrationen an Clostripain bei einem DMSO-Anteil von 12%

Inhibitorkonzentration (E-64) [μM]	Prozent Inhibition [%]
0,2	k.l.
	10,2
2	18,2
	20,4
20	65,0
	64,7

Tabelle A.6.4: Prozent Inhibition an Clostripain bei einer Inhibitorkonzentration von 20 μM

Inhibitor	ohne Brij35, 12% DMSO	ohne Brij35, 4% DMSO	0,005% Brij35, 12% DMSO	0,005% Brij35, 4% DMSO
Miconazolnitrat	22,9	94,2	k.l.	3,44
	23,0	96,7	k.l.	0,89
	34,2	95,9	k.l.	0,19
	33,7	95,7	k.l.	1,77
Substanz 7	6,81	93,7	6,04	2,84
	28,6	93,1	3,62	0,79
	7,52	93,1	k.l.	k.l.
	18,7	94,6	k.l.	k.l.

Ergebnisse der Selektivitätsmessungen (Kapitel 6.5):

Clostripain-Testung

Substanz	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ nach AMC-Korrektur
1	131,4 (10,9) 20,5 (5,75)	138,5 (9,93) 21,9 (5,45)
1 plus DTT	7,75 (17,9) 618,7 (17,4)	7,70 (19,9) 921,4 (2292,7)
5	9,25 6,92	8,89 6,43
5 plus DTT	19,6 16,0	19,3 15,6
11	0,208 0,147	0,204 0,142
11 plus DTT	0,147 0,233	0,141 0,210
7	1,42 1,81	---
7 plus Triton X-100	k. K. k. K.	---
8	1,92 0,941	---
8 plus Triton X-100	103,9 128,6	---

() ohne 10 µM bei Substanz 1

Clostripain Testung-Wiederholungsmessung

Substanz	IC ₅₀ [µM]	IC ₅₀ nach AMC-Korrektur
1	12,1 19,7	11,7 59,7
1 plus DTT	15,8 15,6	16,0 13,0
11	1,17 1,96	0,119 0,212
11 plus DTT (20 min Inkubation bei RT)	1,32 2,60 ¹⁾	0,139 0,765

¹⁾ hoher slope factor

Cathepsin B Testung (270411)

Substanz	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ nach AMC-Korrektur
1	25,0	27,1
	22,2	23,2
1 plus DTT	51,0	68,1
	51,6	61,4
5	453,1	449,7
	611,5	496,4
5 plus DTT	1364,9	k. K. ²⁾
	(117,6)	78,0
11	189,8	97,2
	46,7 ¹⁾	44,3
11 plus DTT	69,8	k. K.
	46,2 ¹⁾	
7	115,6	---
	123,4	
7 plus Triton X-100	122,1	---
	143,2 (slope factor >3) ¹⁾	
8	73,4	---
	81,6	
8 plus Triton X-100	247,6	---
	107,0 ¹⁾	

¹⁾hoher slope factor²⁾k.K.= es konnte keine Kurve durch die Punkte gelegt werden**Caspase-1 Testung**

Substanz	Inhibition [%]	Inhibition [%] nach AMC-Korrektur
1	62,1	61,7
	54,2	53,4
1 plus DTT	23,6	20,7
	19,7	16,3
5	8,9	9,8
	4,7	3,3
5 plus DTT	4,3	3,7
	7,5	6,2

Caspase-1 Testung

11 plus DTT	13,0 8,2	3,1 k.l. ¹⁾
7	k.l.	---
7 plus Triton X-100	---	---
8	k.l.	---
8 plus Triton X-100	---	---

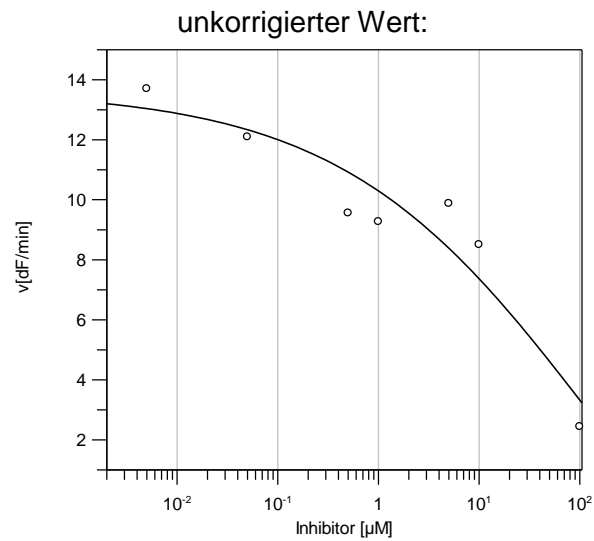
¹⁾ k.l. = keine Inhibition**Calpain-1 Testung**

Substanz	Inhibition [%]	nach AMC-Korrektur
1	39,8 34,9	38,3 34,1
1 plus DTT	10,8 6,9	8,5 5,9
5	1,1 0,6	1,0 k.l. ¹⁾
5 plus DTT	k.l. 0,6	k.l. k.l.
11	10,6 15,6	0,3 6,3
11 plus DTT	k.l. k.l.	k.l. k.l.
7	k.l.	---
7 plus Triton X-100	k.l.	---
8	k.l.	---
8 plus Triton X-100	k.l.	---

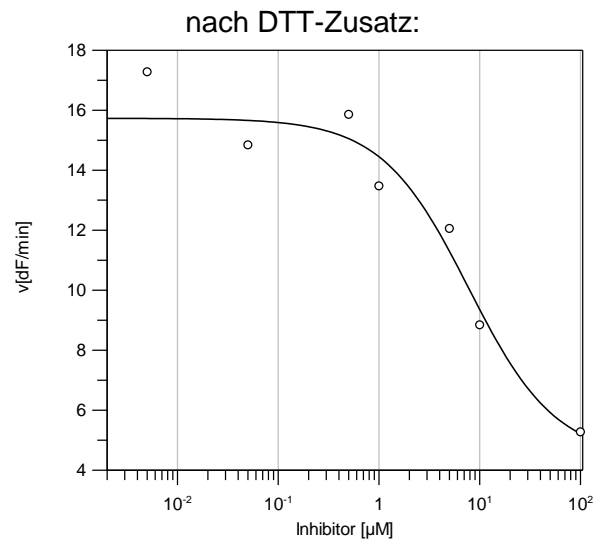
¹⁾ k.l. = keine Inhibition

IC₅₀-Werte der Testsubstanzen gemessen an Clostripain:

Substanz 1:



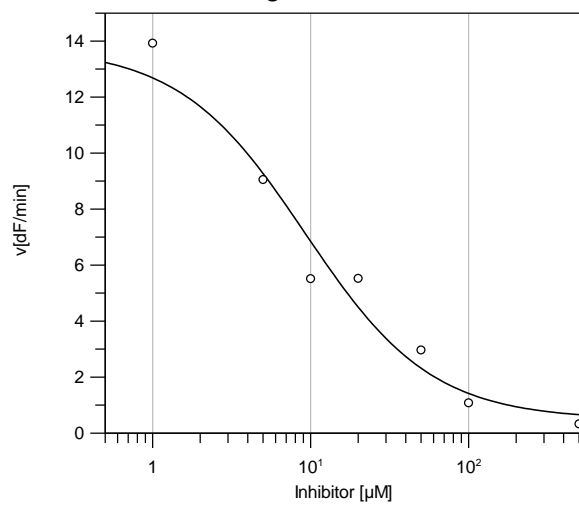
Parameter	Value	Std. Error
Y Range	21,6811	3,7609
IC 50	131,4452	134,3511
Slope factor	0,3480	0,1040
Background	-8,0337	3,6663



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	11,3207	2,7639
IC 50	7,7580	4,9549
Slope factor	1,0037	0,5331
Background	4,4102	2,4285

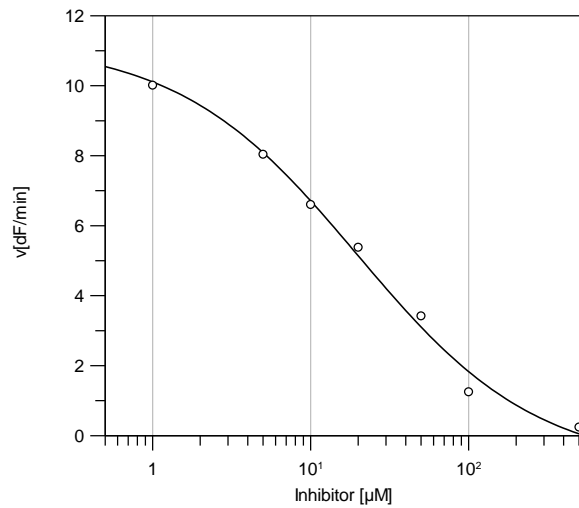
Substanz 5:

unkorrigierter Wert:



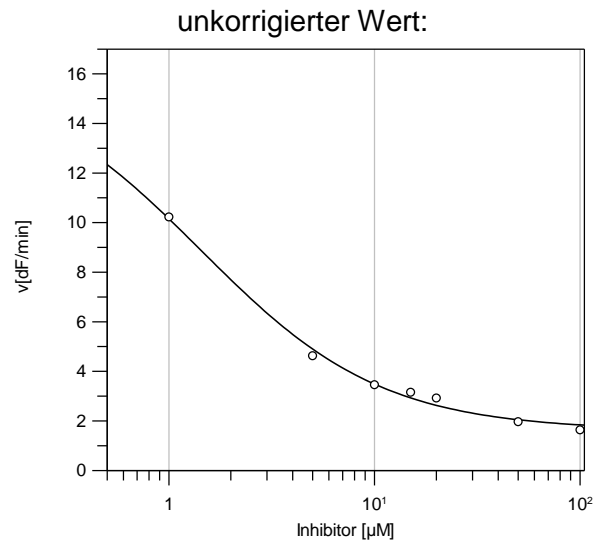
Parameter	Value	Std. Error
Y Range	13,2886	1,8467
IC 50	9,2522	3,0643
Slope factor	1,0864	0,3416
Background	0,4862	1,2658

nach DTT-Zusatz:

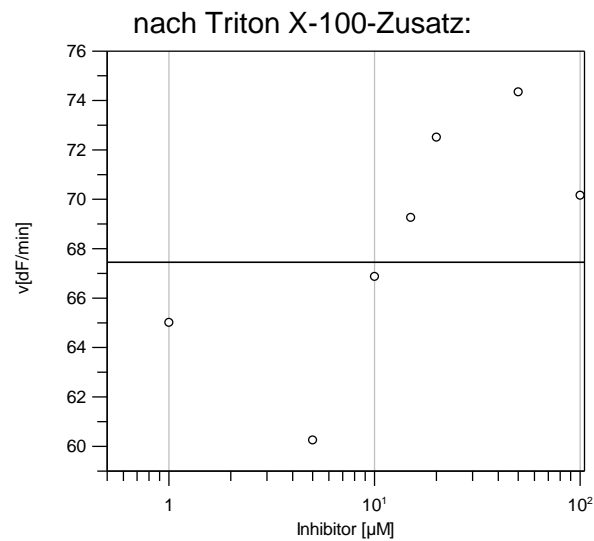


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	12,1422	0,9037
IC 50	19,7530	4,3172
Slope factor	0,7624	0,1022
Background	-0,9011	0,7426

Substanz 7:

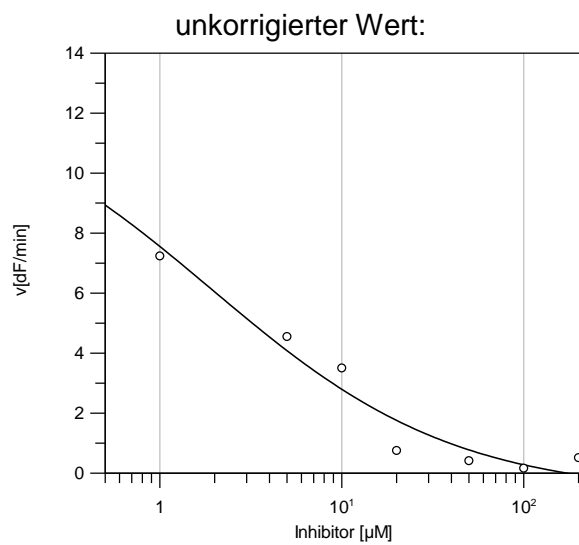


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	14,5385	0,3658
IC 50	1,4271	0,1165
Slope factor	0,9842	0,0790
Background	1,6218	0,2487

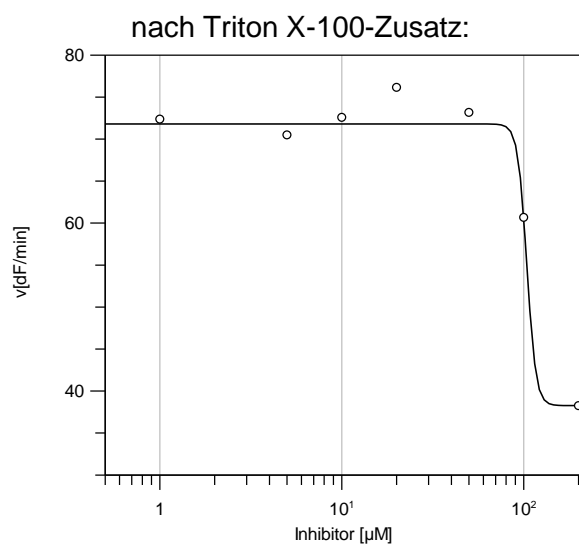


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	10,9189	532,0371
IC 50	-14,8004	0,0000
Slope factor	-0,7740	0,0000
Background	56,5357	532,0371

Substanz 8:

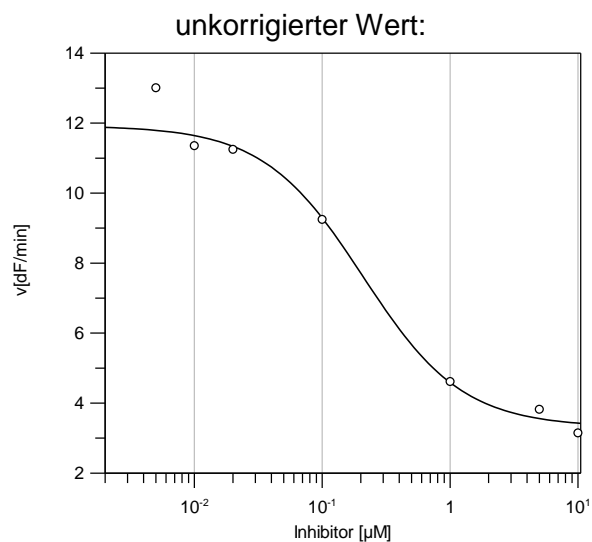


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	13,6778	1,4081
IC 50	1,9210	0,7443
Slope factor	0,6468	0,1874
Background	-0,7082	1,1307

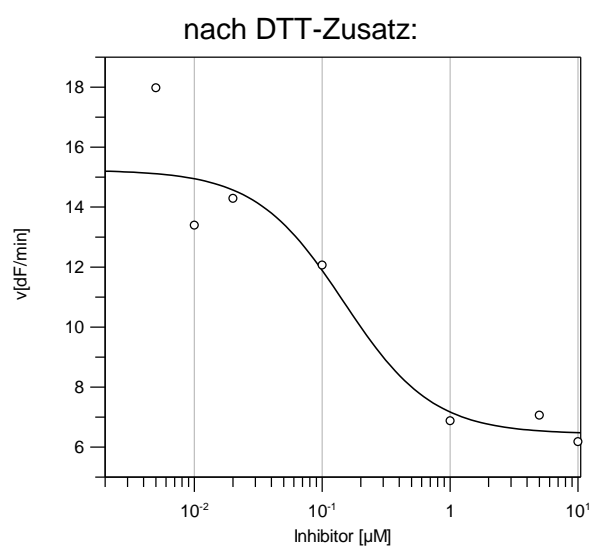


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	33,5364	4,0477
IC 50	103,9341	80,1826
Slope factor	17,6141	246,0102
Background	38,2665	3,7477

Substanz 11:



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	8,6098	0,9732
IC 50	0,2080	0,0917
Slope factor	1,1149	0,4688
Background	3,3150	0,7155

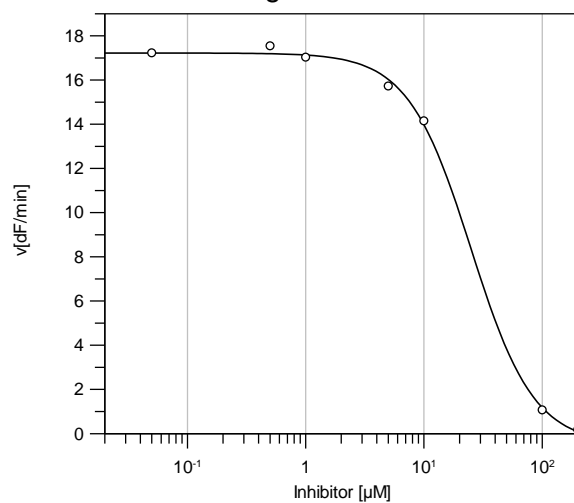


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	8,8018	2,0698
IC 50	0,1474	0,1243
Slope factor	1,2528	1,5360
Background	6,4346	1,3988

IC₅₀-Werte der Testsubstanzen gemessen an Cathepsin B:

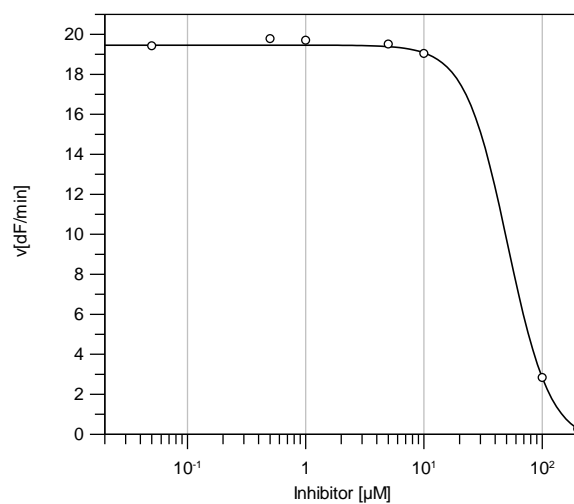
Substanz 1:

unkorrigierter Wert:



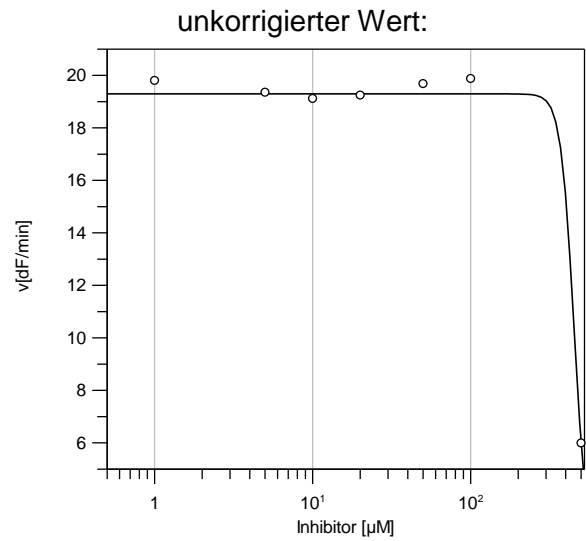
Parameter	Value	Std. Error
Y Range	17,7111	0,5521
IC 50	25,0115	2,9730
Slope factor	1,6323	0,1638
Background	-0,4894	0,5123

nach DTT-Zusatz:

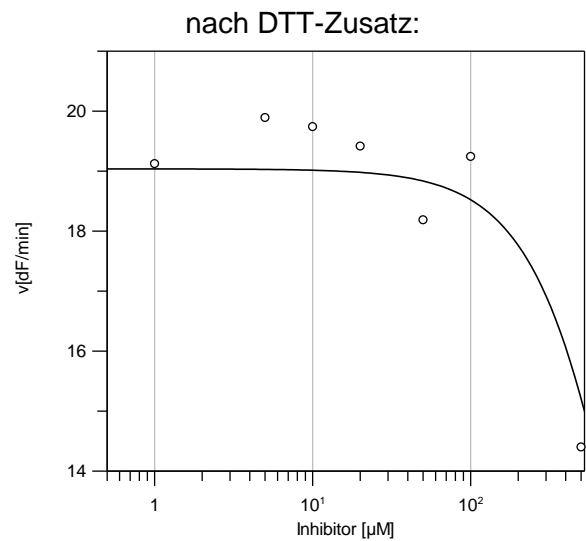


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	19,8952	0,7192
IC 50	50,9659	6,6907
Slope factor	2,4133	0,5275
Background	-0,4362	0,6543

Substanz 5:

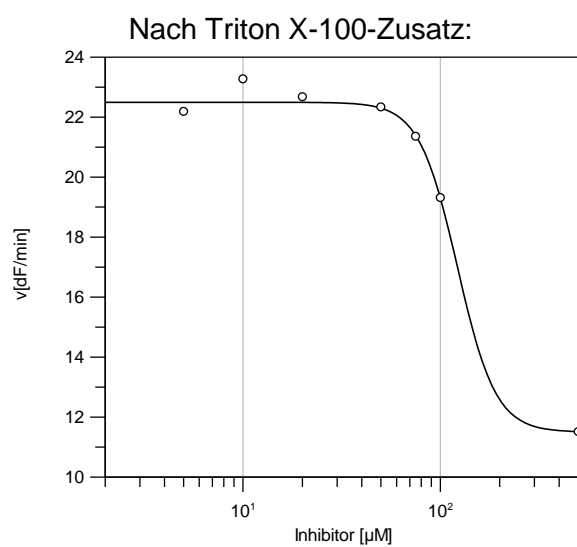
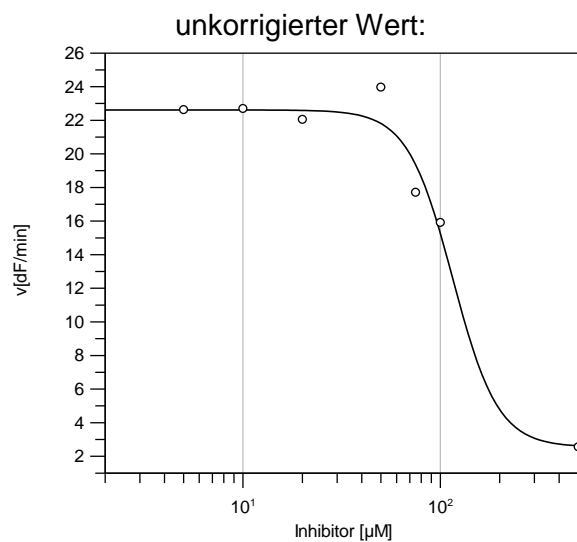


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	18,1390	20,4605
IC 50	453,1433	722,6076
Slope factor	10,2740	160,8809
Background	1,1542	20,4603

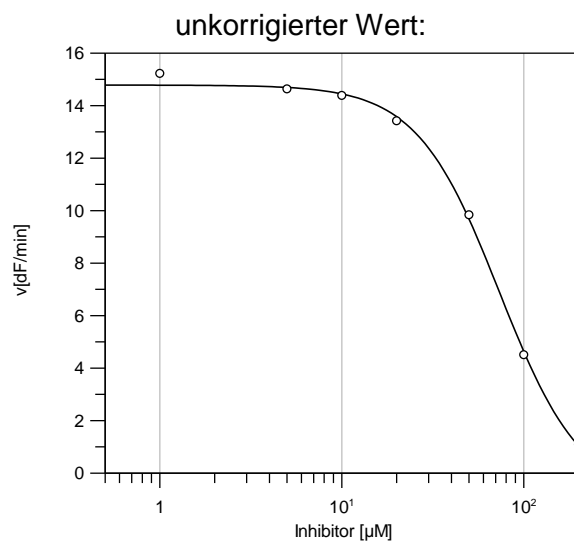


Parameter	Value	Std. Error
Y Range	19,0081	67,2914
IC 50	1364,8985	5825,3129
Slope factor	1,3707	5,0807
Background	0,0286	67,0506

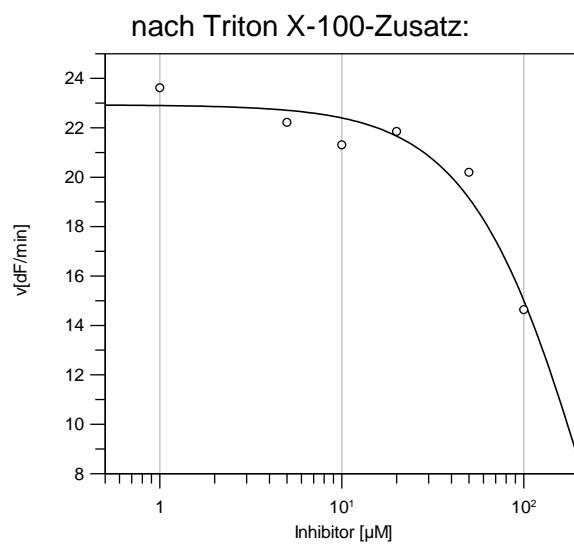
Substanz 7:



Substanz 8:



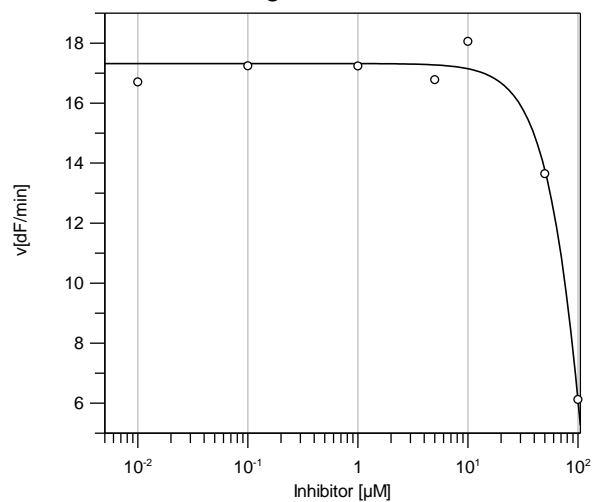
Parameter	Value	Std. Error
Y Range	15,7542	0,9564
IC 50	73,3580	5,8375
Slope factor	1,9170	0,2088
Background	-0,9724	0,8886



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	33,3181	47,4614
IC 50	247,5541	556,0499
Slope factor	1,2850	0,5127
Background	-10,3880	47,2136

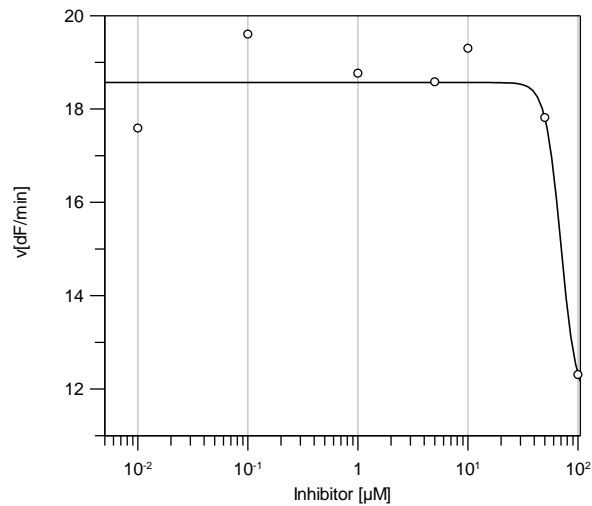
Substanz 11:

unkorrigierter Wert:



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	49,7189	51,7419
IC 50	189,7649	148,7985
Slope factor	1,9244	0,4025
Background	-32,4005	51,7283

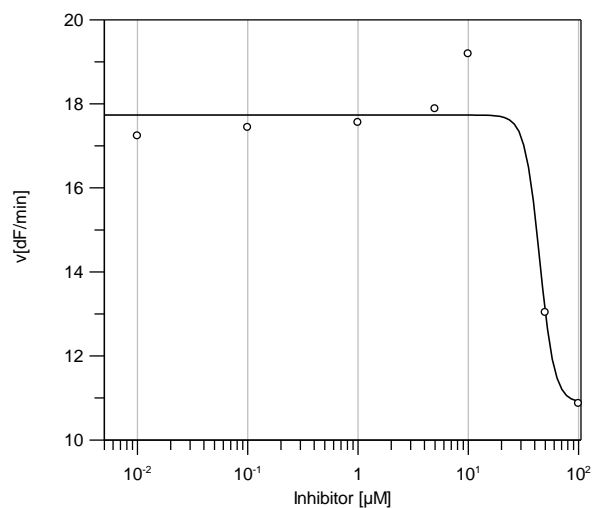
nach DTT-Zusatz:



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	6,9082	24,0655
IC 50	69,8432	204,0587
Slope factor	6,2709	38,2116
Background	11,6597	24,0642

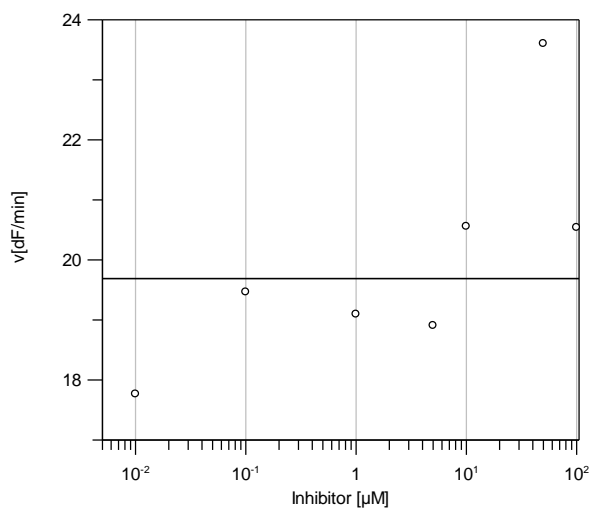
Vergleich der IC_{50} -Werte von Substanz **11** an Cathepsin B nach Korrektur des inneren Filtereffektes einmal ohne und einmal nach DTT-Zusatz (700 μ M) (siehe Kapitel 6.5):

ohne DTT-Zusatz:



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	6,8448	0,6310
IC 50	44,3191	9,2283
Slope factor	6,4929	9,5326
Background	10,8880	0,5923

nach DTT-Zusatz:



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	-1,2050	2016,6311
IC 50	-36,7060	0,0000
Slope factor	-0,6359	0,0000
Background	20,8914	2016,6311

Lebenslauf

Name	Stephanie Kristin Ludewig
Geboren am	31. August 1983
Geburtsort	Göttingen
1989 - 1993	Katholische-Grundschule in Celle
1993 – 1995	Orientierungsstufe Westercelle in Celle
1995 - 2002	Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium in Celle
2002	Allgemeine Hochschulreife
10/2002 - 10/2006	Studium der Pharmazie an der TU Braunschweig
11/2006 - 04/2007	erster Abschnitt des praktischen Jahres in der Löns-Apotheke, Celle
05/2007 - 10/2007	zweiter Abschnitt des praktischen Jahres im Arbeitskreis von Prof. Dr. Knut Baumann, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, TU Braunschweig
12/2007	Approbation als Apothekerin
11/2007- 09/2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Prof. Dr. Knut Baumann
01/2011	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik
seit 10/2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Merz Consumer Care GmbH, Frankfurt